

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION "PHARMACIE"

par

Claude M. GRANDJEAN-RADOWITCH

Pharmacien

Diplômée d'Études supérieures de Microbiologie

Diplômée d'Études spéciales de Sérologie

Lauréate de l'Université et de la Faculté de Pharmacie de Nancy (Médaille d'or)

Ex-monitrice de Microbiologie

Stagiaire de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique

Née à NANCY, le 15 Septembre 1932

Contribution à l'étude de diverses étapes du métabolisme organique (azoté et carboné)

de B. ROSEUS FLUORESCENS J. G. MARCHAL 1937

Soutenue le 20 Mars 1956 devant la Commission d'Examen

PRÉSIDENT M. J. G. MARCHAL, *Professeur*

JUGES } **M. J. SOLEIL, *Professeur***
Mlle S. BESSON, *Maître de Conférences Agrégée*

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION "PHARMACIE"

par

Claude M. GRANDJEAN-RADOWITCH

Pharmacien

Diplômée d'Études supérieures de Microbiologie

Diplômée d'Études spéciales de Sérologie

Lauréate de l'Université et de la Faculté de Pharmacie de Nancy (Médaille d'or)

Ex-monitrice de Microbiologie

Stagiaire de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique

Née à NANCY, le 15 Septembre 1932



Contribution à l'étude de diverses étapes du métabolisme organique (azoté et carboné)

de **B. ROSEUS FLUORESCENS** J. G. MARCHAL 1937

Soutenue le 20 Mars 1956 devant la Commission d'Examen

PRÉSIDENT . . . M. J. G. MARCHAL, *Professeur*

JUGES } M. J. SOLEIL, *Professeur*
 } M^{lle} S. BESSON, *Maître de Conférences Agrégée*

THÈSE
Présentée
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY
pour obtenir
le titre de Docteur de l'Université de Nancy
MÉDECINE
par
CISIDE M. GRANDJEAN-RADOWITCH
Contribution à l'étude de divers états
du métabolisme organique (acides et carbonés)
M. B. BOSSON, NANCY, 1937

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Defendue le 20 Mars 1938 devant la Commission d'Examen
PRÉSIDENT : M. J. S. MARCHAL, Professeur
M. B. BOSSON, NANCY, 1937
https://archive.org/details/IA41555802_0006

000000 000000 000000 000000 000000 000000 000000 000000

Doyen : F. KAYSER
Assesseur : A. MEUNIER
Secrétaire : P. RADUREAU

Professeurs

Maîtres de Conférences Agrégés

Chargés de cours complémentairesChefs de TravauxDélégués chefs de travaux

M. RENE Chargé des travaux pratiques de Physique

Maître de conférences honoraire: D^r VERNIER P.

A la mémoire de mon Grand-père

GEORGES MORISOT

Pharmacien

Mort pour la France

A MA MERE

modeste témoignage de ma très
profonde affection et de ma
reconnaissance.

A MON MARI

A MA GRAND'MERE ET A MA TANTE

En gage de ma très vive affection.

A MA FAMILLE ET A MES AMIS

A MON MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR J.G.MARCHAL

Hommage de,profonde gratitude et
témoignage de vive reconnaissance.

A MES JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. SOLEIL

MADemoiselle S. BESSON

Maître de Conférences

Hommage respectueux

[illegible]

Pages:

三

- GENERALITES -

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : METHODES EMPLOYEES POUR L'EXPLORATION DES METABOLITES MICROBIENS	8
§ 1. Méthodes chimiques	8
§ 2. Méthodes de mesure de la respiration	15
§ 3. Méthodes de mesure de la croissance biophotométrie	16
CHAPITRE II: LA CHROMATOGRAPHIE	
§ 1. <u>Généralités sur la chromatographie</u>	19
- Historique	19
- Principe de la chromatographie par adsorption	22
- Application de la chromatographie par adsorption aux acides aminés	24
- la chromatographie sur papier	26
1° <u>principe</u>	26
2° <u>techniques générales</u>	27
(1) chromatographie en une dimension	27
(2) chromatographie en deux dimensions	32
3° <u>papiers utilisés</u>	32
4° <u>protocole général</u>	33
5° <u>application de la chromatographie sur papier à la Microbiologie</u>	34
§ 2. <u>Application de la chromatographie sur papier à la séparation et à l'identification des acides aminés.</u>	36
1° Préparation de la solution à chromatographier	36
A) Dessalage	37
B) Extraction des acides aminés	40
2° Préparation du chromatogramme	42
3° Solvants utilisés	43
4° Révélation	46
5° Application au dosage des acides aminés	53
6° Méthodes spéciales de chromatographie des acides aminés	55

§ 3. <u>Application de la chromatographie sur papier à la</u> <u>séparation et à l'identification des acides organiques</u>	60
A) Chromatographie des acides organiques hydrosolubles et non volatils	60
B) Chromatographie des acides cétoniques sous forme de leur 2-4 DNP hydrazone	64
CHAPITRE III : ELECTROPHORESE	70

- PARTIE EXPERIMENTALE -

INTRODUCTION	77
CHAPITRE I : UTILISATION DES ACIDES AMINES PAR B. ROSEUS FLUORESCENS	81
§ 1. Etude de la croissance	81
§ 2. Etude de la désamination	85
§ 3. Etude de la transamination	94
CHAPITRE II: ELABORATION D'ACIDES AMINES PAR B. ROSEUS . FLUORESCENS CULTIVE SUR DIVERS MILIEUX A BASE D'ACIDES ORGANIQUES	99
§ 1. Matériel nécessaire: milieux de culture	100
Préparation d'acides cétoniques:	
A) acide oxaloacétique	101
B) acide α -céto-glutarique	103
§ 2. Etude de la croissance	106
§ 3. Recherche des acides aminés libres élaborés par B. roseus fluorescens sur divers milieux synthétiques à base d'acides organiques	109
CHAPITRE III : ETUDE DU METABOLISME DE QUELQUES ACIDES ORGANIQUES CHEZ B. ROSEUS FLUORESCENS	117
§ 1. Etude de la croissance	117
§ 2. Etude de la respiration et du métabolisme oxydatif de B. roseus fluorescens	127
A) action de quelques inhibiteurs sur la respiration de B. roseus fluorescens	131
B) recherche des déshydrogénases de B. roseus fluorescens.	140
§ 3. Culture de B. roseus fluorescens en présence de divers acides organiques: recherche de ces compo- sés existant à l'état libre dans les milieux de culture	142

CHAPITRE IV : QUELQUES OBSERVATIONS SUR LA CHROMOGENESE DE B. ROSEUS FLUORESCENS	I50
CONCLUSIONS GENERALES	I60
BIBLIOGRAPHIE	I67
Index alphabétique	I92

o
o o

- AVANT - PROPOS -

=====

Je commençais mes études à la Faculté de Pharmacie de Nancy, lorsque Monsieur le Professeur MARCHAL m'accueillit dans son Laboratoire.

Depuis déjà six années, il est pour moi le Maître bienveillant, auquel je dois toute ma formation micro-biologique. Durant mes années de scolarité, puis celle des Certificats supérieurs, il s'est dépensé sans compter, prodiguant son enseignement et ses conseils.

Stagiaire de recherches au C.N.R.S. depuis bientôt deux ans, j'ai la grande joie de pouvoir participer à un travail de recherches sous sa direction et je fus plus particulièrement comblée, lorsque mon Maître me proposa le sujet du travail que j'expose aujourd'hui.

Il m'est impossible d'exprimer ici toute la gratitude et le respect que j'éprouve vis à vis de Monsieur le Professeur MARCHAL. Je veux simplement espérer qu'il trouvera dans ce modeste travail, l'expression de mes remerciements très sincères pour tout ce qu'il a fait pour moi et l'assurance de mes très respectueux sentiments.

J'ai eu maintes fois l'occasion d'avoir recours à Monsieur le Professeur SOLEIL, durant ce travail. Il m'a toujours accueillie avec bienveillance dans son Laboratoire et j'ai reçu de lui de nombreux conseils que sa profonde connaissance de la Chimie rendaient encore plus précieux. Il a su m'initier à la Chimie Organique avec une grande indulgence et une grande patience et c'est pour moi un grand honneur de le compter parmi les Juges de ce travail. J'exprime à Monsieur le Professeur SOLEIL toute ma gratitude et je l'assure de mes sentiments très respectueux.

Que Mademoiselle BESSON trouve dans cet ouvrage, l'hommage reconnaissant que je rends à son dévouement et à ses multiples connaissances scientifiques. Durant la scolarité, elle m'a toujours témoigné une bienveillante attention et depuis que je prépare cette thèse, j'ai maintes fois abusé de sa complaisance. L'avoir dans mon Jury de Doctorat, avait toujours été mon plus cher désir: soyez donc doublement remerciée, Mademoiselle, et croyez

à ma très respectueuse affection.

Je veux en ce jour, remercier également Madame LASSEUR. Elle a contribué amplement dès mon arrivée dans ce Laboratoire, à créer autour de moi cette ambiance si chaude, seule atmosphère propice à un travail fécond. Son enseignement, ses conseils judicieux ont contribué largement à ma formation de "microbiologiste"; soyez assurée, Madame, de ma respectueuse reconnaissance.

Que Messieurs les Professeurs et Chefs de Travaux de la Faculté de Pharmacie de Nancy trouvent ici l'hommage de mes sentiments respectueux et dévoués: je garde de mes cinq années de Faculté un souvenir ineffaçable.

Mes remerciements vont également à tous mes camarades du Laboratoire de Microbiologie et plus particulièrement à Madame POUTEAU, dont les conseils m'initient aux mystères de la technique de Warburg.

Cette thèse n'est pas pour moi un adieu puisque j'ai encore la grande joie de continuer de travailler sous la direction de mon Maître, Monsieur le Professeur MARCHAL.

Elle me permet d'exprimer ma gratitude et ma reconnaissance à mon Maître, et à tous ceux qui contribuèrent à faire de moi un "Pharmacien". J'ai passé et je passe encore au Laboratoire de Microbiologie, des heures magnifiques et je souhaite à tous ceux qui me suivront, d'y retrouver ce même climat de chaleureuse sympathie.

o
o o

- G E N E R A L I T E S -

=====

- I N T R O D U C T I O N -

=====

C'est en 1878 que SEDILLOT, avec l'approbation de LITTRE, inventa le mot "MICROBE" pour désigner les "animacules".

Depuis la découverte de VAN LEEUWENHOECK (1676), il fallut attendre les travaux de PASTEUR (1877) pour voir se développer ce que nous appelons maintenant la Microbiologie et, à l'origine, son évolution s'était surtout effectuée sur le plan médical.

Actuellement, loin de négliger cette orientation, la Microbiologie voit son domaine s'étendre de plus en plus. Telle que nous la connaissons, la vie sur terre est inconcevable sans microorganismes et, s'il nous faut lutter contre certains, il convient, au contraire d'en favoriser d'autres.

C'est ainsi que nous pouvons diviser la Microbiologie en trois grandes sections:

- 1) l'étude des microorganismes qui contribuent à maintenir la vie sur terre (microorganismes des cycles de l'azote et du soufre, par exemple).
- 2) l'étude des microorganismes pathogènes, tant pour le règne animal que pour le règne végétal, et des moyens efficaces à leur neutralisation.
- 3) l'étude des modifications biochimiques diverses causées par les microorganismes et de leurs produits élaborés.

Cette partie tend de plus en plus à se développer, tant sur le plan théorique que sur le plan pratique.

Sur le plan théorique, l'étude du métabolisme microbien permet à VAN NIEL d'établir une classification des microorganismes.

Sur le plan pratique, elle englobe les préparations de ferments lactiques, de levures industrielles, d'enzymes, d'antibiotiques, d'aliments divers (boissons alcoolisées, fromages, cacao), des applications industrielles (rouissage, épuration des eaux résiduelles, préparation du caoutchouc et du tabac) et

des emplois analytiques multiples (dosage de sucres, de vitamines).

Les recherches sont de plus en plus dirigées vers l'étude des métabolismes et plus particulièrement des métabolismes intermédiaires.

De même que tous les êtres vivants, les microorganismes ont besoin d'énergie. L'énergie lumineuse peut être utilisée par les plantes qui contiennent de la chlorophylle et par quelques bactéries, tandis que, pour le reste du monde vivant et par conséquent pour la grande majorité des microorganismes, la seule source convenable est fournie par l'énergie chimique.

Le besoin d'énergie des microorganismes est manifeste: pour leur croissance et leur multiplication, pour les synthèses destinées à édifier du nouveau matériel cellulaire, pour le maintien de leur potentiel d'oxydo-réduction, ils puisent dans le milieu ambiant les substances nécessaires. Si ces dernières ne sont pas directement assimilables, le microorganisme peut être muni d'un système enzymatique capable de dégrader différents produits, jusqu'à un stade propre à être utilisé, et à lui fournir par contrecoup l'énergie dont il a besoin. C'est à cette propriété que l'on donne le nom de "desmolyse". Elle peut se faire soit avec intervention directe de l'oxygène (respiration), soit sans l'intervention de l'oxygène (fermentation).

Après avoir étudié la respiration des tissus et des Bactéries, on alla jusqu'à étudier les oxydations, sources d'énergie, dans la cellule elle-même, et on a rangé ces phénomènes dans les processus de la respiration. C'est alors qu'il devient difficile de distinguer respiration et fermentation, si l'on considère les conditions dans lesquelles l'oxygène libre n'intervient pas.

On est alors amené à admettre que la respiration est la suite des phénomènes dans lesquels, à la phase finale, intervient l'oxygène libre, après tout un enchaînement de processus pouvant être anaérobies. On entend donc par respiration toute activité biologique qui comprend une absorption d'oxygène accompagnée ou non de production de gaz carbonique.

D'après WARBURG, le phénomène fondamental semble consister dans l'activation de l'oxygène moléculaire, activation due au ferment rouge respiratoire et aux cytochromes, composés ferroporphyriniques dans lesquels le fer joue le rôle essentiel.

L'arrêt de ces oxydations sous l'influence des cyanures qui, en se combinant aux atomes métalliques, les empêchent de jouer leur rôle d'activateur, est un grand argument en faveur de ce mécanisme.

Pour WIELAND, au contraire, le rôle essentiel est joué par l'hydrogène, et les processus d'oxydo-réduction ne sont que des transferts d'hydrogène d'une molécule (donneur d'hydrogène) à une autre molécule (accepteur d'hydrogène).

En fait, la question est plus complexe et la plupart des auteurs admettent à la fois l'activation de l'oxygène et le transport de l'hydrogène lors des phénomènes d'oxydation cellulaire. Les réactions qui entrent en jeu, libèrent peu à peu certaines quantités d'énergie, et cet apport est réglable de telle sorte que les synthèses chimiques et les autres manifestations de la vie, s'accomplissent normalement. C'est ce qu'exprimait SZENT-GYÖRGYI (316) en disant que la "cellule a besoin de petite monnaie", que l'oxydation progressive et étagée du substrat lui fournit bien mieux qu'une combinaison brutale entre l'oxygène et l'hydrogène.

Tous les substrats ne sont pas d'égale valeur énergétique: chaque espèce microbienne dégrade d'une façon différente les divers composants de la matière vivante. Certaines bactéries peuvent vivre aux dépens d'une seule source d'énergie, un seul acide aminé par exemple; d'autres, par contre, doivent en trouver plusieurs dans leur substrat pour assurer le maintien de leur vie et leur multiplication.

Certains facteurs de croissance, dont WILDIERS, en 1901, signala le premier l'existence en découvrant le "bios", sont indispensables au maintien de la vie. Ces substances sont tellement nécessaires pour certaines espèces microbiennes, qu'elles ont permis le dosage microbiologique de nombreuses vitamines: riboflavine (*Lactobacillus casei*), vitamine PP (*Lactobacillus arabinosus* et *Proteus* XI9), acide pantothénique (*Lactobacillus arabinosus*), vitamine B₁ (*Phycomyces blakesleeana*), vitamine B₆ (*Neurospora*, *Streptococcus lactis*), acide para-aminobenzoïque (*Acetobacter suboxydans*). Mais il faut admettre divers degrés dans le rôle de ces métabolites essentiels. Si certaines cellules bactériennes en exigent la présence dans le milieu nutritif, d'autres sont capables d'en faire la synthèse. Si une substance donnée, indispensable, n'est pas synthétisée, on devra obligatoirement l'introduire dans le milieu: elle sera alors considérée comme un facteur de croissance (LWOFF -317).

S'il existe un certain pouvoir de synthèse, mais limité et lent, la substance ajoutée agira comme stimulant de croissance. On peut ranger à côté de ces substances, les facteurs dits de départ: tel le rôle de l'ascite ou du sang, nécessaires au départ de certaines cultures microbiennes (méningocoque, gonocoque, Hemophilus).

Enfin, si la synthèse est très rapide, il deviendra inutile d'introduire dans le milieu une substance que le germe fabrique lui-même.

LWOFF définit les facteurs de croissance comme des métabolites essentiels que l'organisme ne peut synthétiser. Par cette définition, il en sépare les facteurs de départ, les stimulants, tout en reconnaissant qu'il s'agit toujours de métabolites essentiels, nécessaires à la vie des micro-organismes.

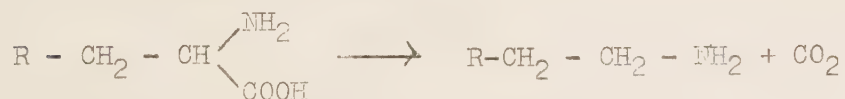
L'étude des enzymes, de leur constitution et de leur mode d'action, a d'ailleurs montré que beaucoup de ces facteurs entrent dans la composition des enzymes, comme coenzymes. C'est ainsi que la vitamine B₆ contrôle diverses fonctions biologiques (désamination -2II-, décarboxylation -I7I,I76,I77-, transamination -I7I,I72,I74-, métabolisme du tryptophane,-I78,I79-), que l'ester pyrophosphorique de la vitamine B₁ constitue la cocarboxylase, tandis que la vitamine PP constitue les di- et triphosphopyridinenucléotides (codéhydrases).

De ce fait, tous ces facteurs vont jouer un rôle primordial dans les métabolismes.

Les bactéries, qui détruisent la molécule protéique, possèdent un pouvoir protéolytique variable suivant les espèces. Elles sont capables de transformer les protéines en polypeptides et en acides aminés.

La dégradation des amino-acides par les microorganismes s'effectue selon plusieurs voies:

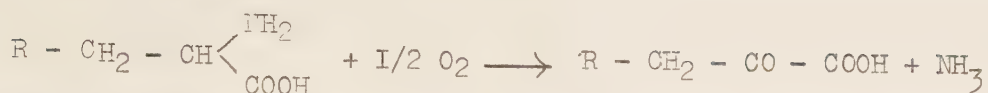
1) par simple décarboxylation et formation d'amine



2) par désamination hydrolytique



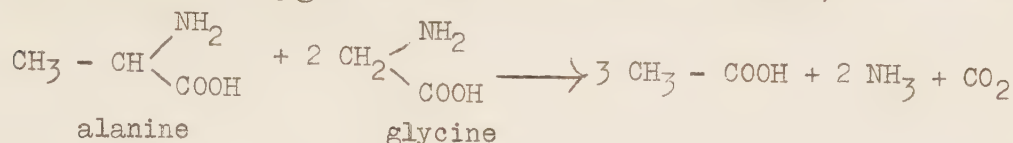
3) par désamination oxydative



4) par transamination (réaction entre acide aminé et acide cétonique)



5) par oxydo-réduction entre deux acides aminés sans intervention d'oxygène (Réaction de STICKLAND).



Le mode de dégradation des glucides est extrêmement variable selon l'espèce microbienne envisagée, et selon les conditions mises en jeu (aérobiose ou anaérobiose). Le stade final aboutit de toute façon à la formation d'acide pyruvique, dont le catabolisme sera différent selon qu'il s'agira de germes anaérobies (fermentation) ou de germes aérobies.

En aérobiose, cet acide peut suivre toute une série de voies métaboliques:

1) passage de l'acide pyruvique à l'acide acétique, donnant naissance à un anhydride d'acétyl et de phosphoryle. La cocarboxylase est nécessaire à la transformation du pyruvate en cet acétylphosphate, que l'on a considéré comme la clé de tous les processus ultérieurs.

2) dismutation:

KORKES, STERN, GUNSALUS et CCHOA ont montré la présence chez *Esch. coli* d'un enzyme catalysant une réaction de dismutation, aboutissant également à la formation d'acétyl-phosphate:



En présence d'acide oxaloacétique, on peut obtenir de l'acide citrique.



Pour cette réaction, la présence d'ions Mg^{++} ou Mn^{++} de coenzyme A et de cocarboxylase, est indispensable.

- 3) intervention d'un cycle de réactions impliquant la participation d'acides tricarboxyliques: cycle de KREBS.
- 4) fixation de gaz carbonique aboutissant à la formation d'acide oxaloacétique (réaction de WOCD et WERKMANN).

SYSTEMES ELEMENTAIRES RESPIRATOIRES DES CELLULES:

Deux systèmes sont actuellement reconnus:

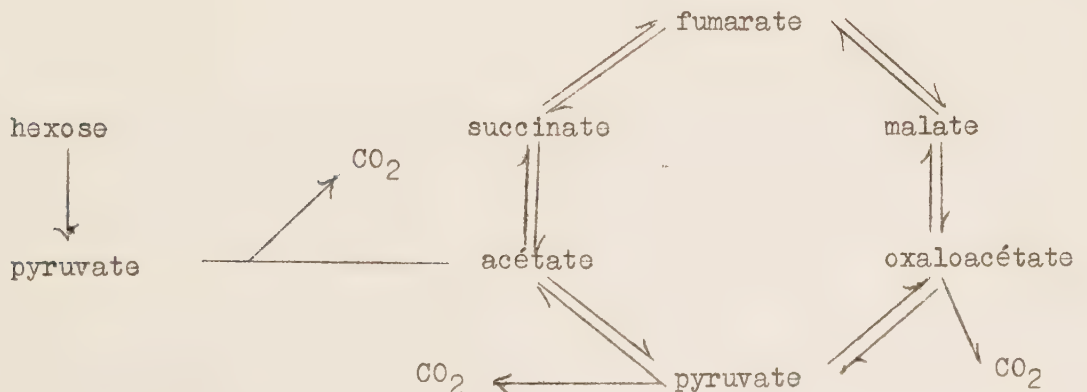
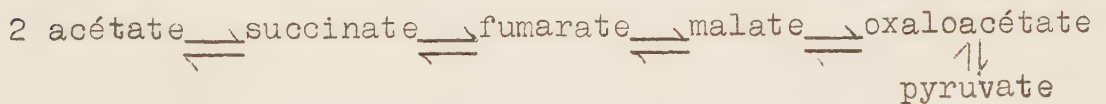
- 1) Cycle de SZENT-GYÖRGYI
- 2) Cycle de KREBS.

I) C Y C L E _ d e _ S Z E N T - G Y Ö R G Y I :

Dans ce cycle, les acides en C_4 jouent un grand rôle et n'ont pas besoin d'être en grande quantité pour catalyser le transport d'hydrogène: ils jouent le rôle de transporteur catalytique.



A ce cycle, nous rapporterons la condensation de deux molécules d'acétate, selon le type THUNBERG, condensation qu'on peut mettre en évidence dans les cultures de Esch. coli (274, 275, 276).

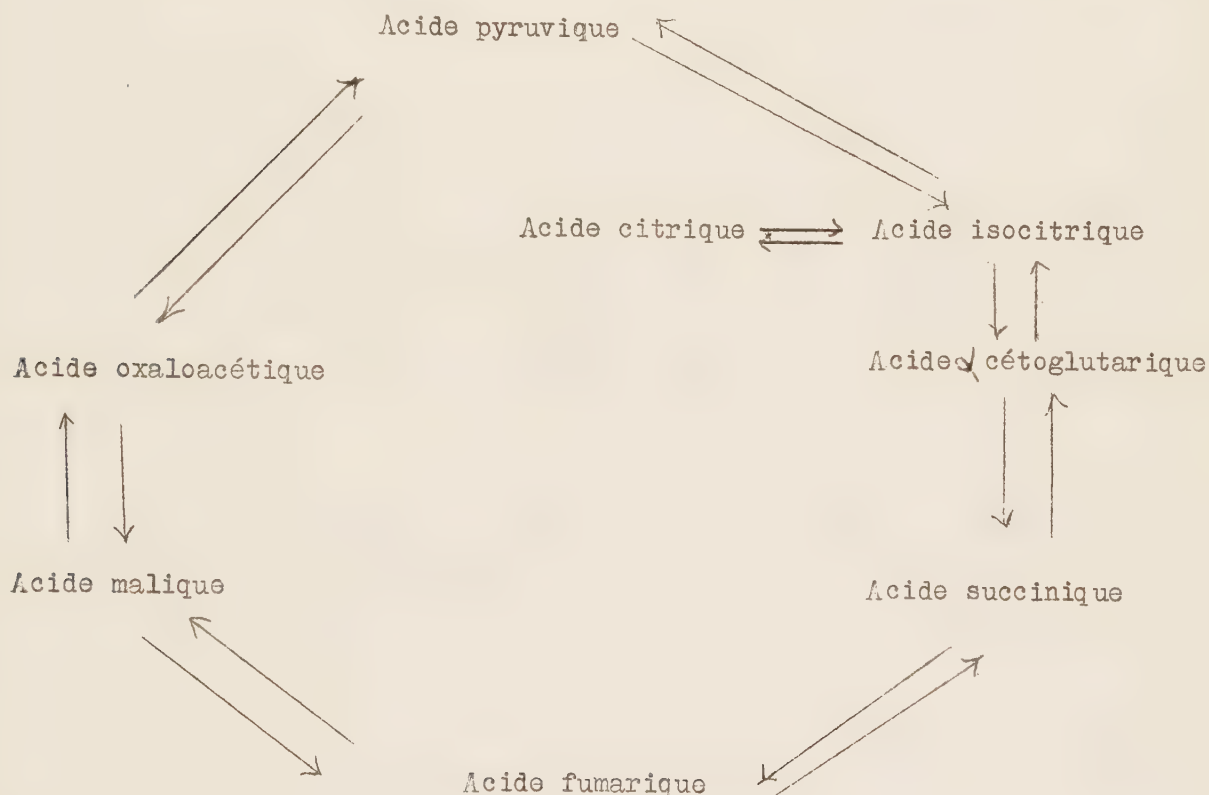


2) C Y C L E d e K R E B S :

KREBS a montré, au cours de recherches faites sur le muscle de pigeon, que l'oxydation des trioses, pouvait s'effectuer selon un mode tout à fait particulier.

On aboutit à l'acide α cétooglutarique, qui peut lui-même être transaminé en acide glutamique, être décarboxylé ou oxydé en acide succinique, chef de file des diacides en C_4 .

Nous pouvons résumer ce cycle selon le schéma suivant:



Si certaines bactéries utilisent pour leur métabolisme un cycle semblable à celui de KREBS (*Aerobacter aerogenes* cultivé sur citrate, *Acetobacter vinelandii*, certains *Pseudomonas* --272.273--, *Micrococcus lysodeikticus* --277--), d'autres ne le peuvent pas (*Azotobacter agilis*. --271--).

L'existence du cycle tricarboxylique maintenant admise pour l'espèce humaine, est toujours une source de discussions chez les Bactéries. S'il est difficile de prouver la participation du cycle de KREBS dans le métabolisme de certaines bactéries, il n'y a pas non plus d'évidence certaine pour la nier (183). Comme l'admet LICHSTEIN (270), la nature de la condensation conduisant à ce cycle est controversée: il se peut qu'il existe plus d'un type de réactions.

- CHAPITRE I -
=====

METHODES EMPLOYEES

POUR L'EXPLORATION DES METABOLISMES MICROBIENS

I - METHODES CHIMIQUES:
=====

Lorsque l'on étudie le métabolisme des Bactéries, il faut non seulement mettre en évidence des produits qui sont le terme d'une réaction, mais encore leurs intermédiaires. Leur identification ne peut pas toujours être faite par les méthodes habituelles de la chimie analytique, parce que ces produits se trouvent élaborés en quantités minimes, et dispersés dans un milieu très complexe .

Dans ces recherches particulières, protéines et lipides ne sont pas en général intéressants: le plus souvent, il est nécessaire de les éliminer des milieux où l'on doit opérer. Pour arriver à ce but, on emploie habituellement la précipitation par l'alcool ou la délipidation par un solvant des graisses.

PREVOT (1948) a proposé la technique suivante pour identifier les produits élaborés par les microorganismes, et qui consiste à :

1°) Rechercher les produits volatils, neutres ou alcalins: (alcools, cétones, aldéhydes, amines volatiles)

La culture microbienne, ajustée à pH = 8,2, est distillée lentement pour en recueillir le 1/5 environ en une heure.

Sur le distillat alcalin, on caractérise:

A) les alcools par la réaction au bichromate de potassium.

A 1 ml de distillat, on ajoute 1 ml d'une solution de

bichromate de potassium dans l'acide nitrique (1,10%).

Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration bleue après un séjour de 2 minutes au bain-marie à 100°C.

-----L'alcool éthylique est mis en évidence par la formation d'iodoforme: à 2 ml de distillat, on ajoute quelques gouttes de lessive de soude et une solution iodo-iodurée de Lugol, jusqu'à coloration brunâtre, que l'on fait disparaître par addition de 1 goutte de lessive de soude. On laisse refroidir.

La réaction est positive si l'on constate l'apparition d'une odeur d'iodoforme et la formation, après 24 heures, de cristaux jaunes hexagonaux que l'on peut rechercher au microscope dans le dépôt formé.

-----Les alcools supérieurs sont oxydés par le mélange sulfo-chromique, en acides correspondants (alcools primaires) ou en cétones correspondantes (alcools secondaires) que l'on caractérise après distillation.

B) les aldéhydes:

(1) par action du réactif de Schiff:

dont la composition est la suivante:

(solution aqueuse de fuchsine à 1%	1000 ml
(sulfite acide de sodium à 30° Baumé	20 ml
(acide chlorhydrique pur	10 ml

A 2 ml de distillat, on ajoute 1 ml de réactif: il doit y avoir recoloration en rouge du réactif, à froid, s'il y a présence d'aldéhydes.

(2) par le réactif de Tollens:

(nitrate d'argent	3 g
(ammoniaque	30 ml
(lessive de soude	30 ml

Une réaction positive se traduit par la formation, à froid, d'un dépôt noir d'argent métallique, après mélange de 1 ml de réactif à 2 ml de distillat.

(3) par la liqueur de Fehling:

Si le distillat contient des aldéhydes, il y a

réduction à froid de la liqueur cupro-potassique.

C) les cétones:

(I) par le réactif de Nessler, dont la composition est la suivante:

solution A: { chlorure mercurique 13,55 g
 { iodure de potassium 36 g
 { eau distillée 500 ml

solution B: { soude 135 g
 { eau distillée 500 ml

Le réactif se prépare en mélangeant 19 ml de la solution A, à 8 ml de la solution B.

Avec les cétones, il donne un précipité blanc-jaunâtre, soluble dans un excès d'acétone.

L'acétone est différenciée des autres corps cétoniques par le réactif de Scott-Wilson dont la composition est la suivante:

{ cyanure de mercure 10 g.
{ eau distillée 600 ml

A cette solution, on ajoute:

{ soude 180 g
{ eau distillée 600 ml

Puis lentement on incorpore la solution suivante:

{ nitrate d'argent 2,90 g.
{ eau distillée 400 ml

Ce réactif limpide est précipité par les cétones: l'acétone donne un précipité blanc alors que les autres cétones forment un précipité gris-noir.

D) les amines volatiles:

A 1 ml de distillat, on ajoute 1 ml de réactif de Mayer dont la composition est la suivante:

{ iodure mercurique 45 g.
{ iodure de potassium 33 g
{ eau distillée 1000 ml

La réaction est positive si, après ébullition et refroidissement, il se forme un trouble blanchâtre, puis un précipité brun.

2°) Rechercher les acides de fermentation:

A) Acides volatils:

Le liquide ayant servi à la recherche des produits volatils, est acidifié à l'aide d'acide tartrique et les acides gras libérés sont entraînés à la vapeur.

L'acidité totale est titrée volumétriquement.

On établit ensuite une courbe de distillation fractionnée que l'on compare avec la courbe théorique donnée à l'aide des tables de DUCLAUX.

Seul l'acide acétique se retrouve à l'état pur, tandis que les autres acides aliphatiques (de C_1 à C_6) se retrouvent toujours associés deux par deux, ou trois par trois.

B) Acides fixes:

Ces acides sont extraits par contact avec de l'éther sulfurique des milieux de culture, acidifiés par l'acide sulfurique.

L'éther évaporé, laisse un résidu qui, repris par l'eau distillée, servira à la caractérisation des acides fixes.

I) Acide lactique:

II gouttes de la solution aqueuse sont placées dans un récipient avec V gouttes d'acide sulfurique concentré et mises au bain-marie bouillant durant 5 minutes. Après refroidissement, on dépose à la surface, quelques gouttes d'une solution alcoolique de gaiacol à 10%.

En présence d'acide lactique, il se développe une coloration rouge intense.

2) Acide pyruvique: réaction de Simon:

Dans un tube à essais, mettre:

(solution à analyser	1 ml
(acide acétique à 40%	0,5 ml
(nitroprussiate de sodium à 1%	3 ml
(ammoniaque diluée au 1/2	1,5 ml

L'apparition d'une coloration bleue indique la présence d'acide pyruvique.

3) Acide succinique:

Quelques gouttes de la solution à analyser sont placées avec de l'eau ammoniacale dans une capsule et évaporées à sec au bain-marie. On reprend le résidu par de l'eau distillée et on ajoute quelques gouttes d'une solution de perchlorure de fer.

Une réaction positive se caractérise par l'apparition d'un précipité gélatineux de couleur ocre dû au succinate ferro-ammoniacal.

3°) Rechercher directement certains produits dans les milieux de cultures:

Certains produits peuvent être mis directement en évidence dans les cultures: c'est le cas de l'indole, de l'acétylméthylcarbinol, de l'ammoniac.

A) recherche de l'indole:

Dans le milieu de culture, on introduit 1 ml de solution de nitrite de potassium et 5 gouttes d'acide sulfurique: si la réaction est positive, le milieu se colore en rouge. On peut d'ailleurs rassembler le pigment rouge, par agitation avec 2 ml d'alcool amylique; l'alcool absorbe le pigment et le milieu aqueux devient incolore. (Réaction de Salkowsky).

B) recherche de l'acétylméthylcarbinol: réaction de Voges-Proskauer.

La coloration obtenue après addition à une culture microbienne sur un milieu phosphaté, d'une solution de potasse à 10% est parfois suffisante pour déterminer s'il y a ou non production d'acétylméthylcarbinol.

Pour des recherches plus précises, on ajoute à 20 ml du distillat alcalin d'une culture microbienne:

(sulfate ferreux cristallisé 5 g.
(perchlorure de fer à 30% 25 ml

On chauffe et on recueille le distillat dans le réactif suivant:

{ eau 25 ml
{ chlorure de nickel (solution à 10%) 3 ml
{ chlorhydrate d'hydroxylamine
{ (solution à 20%) 2 ml
{ chlorure d'ammonium (solution à 20%) 5 ml

On ajoute ensuite 0,5 ml d'ammoniaque à 20% et on laisse reposer 12 à 24 heures. On chauffe alors doucement le liquide obtenu dans un ballon fermé, durant une heure et demie; on laisse refroidir d'abord à température ordinaire, puis à la glacière (1 heure).

Le précipité obtenu est filtré, lavé à l'eau distillée, séché, pesé: on a ainsi une détermination quantitative de l'acétylméthylcarbinol formé.

C) recherche de l'ammoniac

La recherche qualitative peut se pratiquer par le réactif de Nessler (par simple mélange).

Le dosage s'effectue par la méthode de Foremann: l'ammoniac du milieu de culture est entraîné par la vapeur d'eau et dosé volumétriquement par de l'acide sulfurique en présence d'alizarine.

Ces différentes recherches constituent un bref résumé de la technique proposée par A.R. PREVOT pour l'identification des produits élaborés par les Bactéries dans les milieux de culture. Elles permettent d'identifier les alcools, aldéhydes, cétones, acides gras formés, mais ne donnent aucune indication ni sur les acides aminés, ni sur certains autres acides organiques, ni sur les glucides.

Les ACIDES AMINÉS peuvent être déterminés en bloc par la réaction colorée à la ninhydrine ou hydrate de tricéto-hydrindène, mais leur séparation est toujours une opération difficile, car leurs propriétés physiques sont généralement assez semblables.

Une cristallisation fractionnée peut être réalisée pour séparer des acides aminés très peu solubles dans l'eau (cystine, tyrosine).

Des méthodes colorimétriques ont été proposées: mais il ne faut jamais perdre de vue, surtout lorsqu'il s'agit d'un milieu biologique complexe, que l'on peut avoir d'autres substances dont le comportement, au cours de la colorimétrie, peut être comparable à celui des amino-acides qu'elles accompagnent. C'est le cas, par exemple, de l'histamine, qui interfère dans le dosage de l'histidine.

Quant aux GLUCIDES, de multiples procédés analytiques ont été proposés pour les extraire des cultures microbiennes. Les oses sont extraits par l'eau bouillante

directement ou après une hydrolyse acide. Le cas des polyosides est des plus complexes; il ne peut être donné de règle générale d'extraction, seule la nature du polyoside dictera le meilleur procédé à employer (hydrolyses acide ou alcaline, digestion enzymatique, emploi de divers solvants).

La purification des solutions obtenues se pratique par simple défécation (par les hydrates métalliques, les sels de métaux lourds, les acides, certains adsorbants - terre à foulon, noir animal et même résines échangeuses d'ions -), ou en combinant des défécations et des extractions dans le cas de polyosides.

L'identification des glucides est réalisée par la détermination de leur pouvoir rotatoire, des points de fusion de leurs osazones ou phénylhydrazones, méthodes nécessitant des quantités de glucides souvent incompatibles avec les possibilités de la chimie bactérienne.

La recherche des intermédiaires ou des produits finaux d'un métabolisme est possible par les méthodes chimiques que nous venons de signaler. Mais en dehors du fait que certains procédés ne sont pas suffisamment sensibles, le principal inconvénient de ces méthodes réside dans le fait qu'il est nécessaire d'opérer sur de grandes quantités de matériel biologique. La séparation et l'identification complètes de certains composés est même parfois impossible (acides aminés).

La mise au point de nouveaux procédés (radioactivité, chromatographie, électrophorèse) permet au contraire d'opérer sur de très petites quantités et met à la disposition de la chimie bactérienne des méthodes très sensibles, capables de déceler tous les métabolites, même en faibles quantités.

L'emploi des RADIO-ELEMENTS et des SUBSTANCES MARQUEES, se généralise de plus en plus. Il est basé sur le fait qu'un organisme vivant ne distingue généralement pas les différents isotopes d'un même élément. Cet organisme métaboliserà donc l'élément marqué de la même façon que l'élément normal, avec la seule différence que les diverses étapes de son métabolisme pourront être suivies grâce à la radioactivité présente.

L'usage des traceurs radioactifs donne d'excellents résultats. Cette méthode nécessite cependant un équipement spécialisé très important, des manipulations assez délicates

demandant une grande habileté: la contamination radioactive est toujours possible lors des expériences et entraînerait des résultats erronés.

La CHROMATOGRAPHIE et l'ELECTROPHORESE sont, au contraire, deux méthodes d'investigation plus facilement applicables, si elles sont exécutées dans leurs conditions optima de réalisation.

Dans nos recherches, une place très importante leur a été réservée: c'est la raison pour laquelle nous leur avons donné dans cet exposé un assez grand développement. Nous traitons plus particulièrement de ces méthodes dans les chapitres 2 et 3 de cette première partie.

II - METHODES DE MESURE DE LA RESPIRATION :

La consommation en oxygène d'une population bactérienne placée dans des conditions physiologiques définies, peut se mesurer grâce à la méthode manométrique de Warburg. La respiration traduit en effet un métabolisme fondamental de la vie bactérienne, et sa mesure donne une valeur numérique de l'activité biologique du microorganisme considéré.

E. WARBURG décrivait déjà en 1900, un manomètre différentiel pour l'étude de la vitesse de formation de l'ozone, qui fut perfectionné par HALDANE en 1902, puis par BANCROFT en 1908. DE SAUSSURE avait déjà utilisé cette méthode pour l'étude du métabolisme, mais, faisant absorber le gaz carbonique formé par un alcali placé directement dans le milieu, il n'était plus dans des conditions physiologiques normales.

La méthode actuelle de O. WARBURG est basée sur la loi de Mariotte: elle consiste à ramener les variations de volume gazeux d'une culture, à une variation de pression à volume constant. La lecture de ces variations permet de calculer la quantité de gaz formée ou disparue dans la culture.

La technique générale de la méthode manométrique de WARBURG et ses applications, ont été mises au point par UMBREIT (204). Ce procédé permet, non seulement d'étudier les échanges gazeux, mais aussi les produits qui peuvent prendre naissance au cours de l'expérience. Il est applicable en particulier à l'étude de l'oxydation de divers substrats par les bactéries non proliférantes - "resting-cells"- (acides aminés, acides organiques), à la recherche de la décarboxylation, de la désamination des acides aminés, à l'influence sur la respiration de substances variées pouvant jouer le rôle d'inhibiteurs ou, au contraire, d'activateurs.

III - METHODES DE MESURE DE LA CROISSANCE:BIOPHOTOMETRIE

Si la respiration traduit un métabolisme fondamental de la vie bactérienne, la croissance microbienne manifeste, par un phénomène "visible directement", l'aptitude d'un microorganisme à utiliser certains substrats.

Tous les auteurs sont d'accord pour distinguer dans le développement des cultures bactériennes, un certain nombre de phases caractérisées par des variations de la valeur du taux de croissance.

J. MONOD (310) a particulièrement étudié ce phénomène, et il distingue:

- 1) la phase de latence
- 2) la phase exponentielle
- 3) le ralentissement et l'arrêt de la croissance
- 4) la phase de décroissance

La PHASE DE LATENCE comprend la période qui s'étend entre l'inoculation du milieu de culture par le microorganisme choisi, et le moment où s'établit le taux de croissance maximum de la phase exponentielle. Pendant cette période, le taux de multiplication est nul ou faiblement positif.

La découverte de ce phénomène est due à Max MULLER (en 1895) et MONOD (310) étudia particulièrement les causes de l'existence de cette phase: facteurs dus au changement de milieu, à l'âge de l'inoculat, aux traitements antérieurement subis par la souche, à la nature du milieu, à la quantité de germes inoculés.

MONOD conclut que, si la phase de latence est l'expression de phénomènes assez divers, il n'existe pas de lien nécessaire entre sa durée et les caractéristiques des autres phases. On pourra donc, pour l'étude des autres étapes du développement, négliger le temps de latence: il n'y a pas d'inconvénient à comparer entre elles, des croissances à temps de latence différents.

La multiplication du microorganisme parvient ensuite à la PHASE EXPONENTIELLE durant laquelle la culture croît à taux constant, la vitesse de développement étant proportionnelle à la densité de la culture. La bactérie parvient alors à une phase maxima stationnaire, dont la durée est extrêmement variable. Puis le taux de la croissance se ralentit, et peut même s'annuler lorsque les circonstances

deviennent défavorables (disparition d'un ou plusieurs aliments, accumulation de déchets toxiques, modification du pH ou de la pression osmotique du milieu).

On atteint alors la PHASE DE DECROISSANCE, qui aboutit à la "mort" des individus. Cette période est extrêmement mal connue: comme le dit J. MONOD (310), il n'est pas de critère certain pour établir que, dans une culture qui a cessé d'être repiquable, tous les individus soient "morts". La mort d'une bactérie n'est réellement bien connue que dans le cas où celle-ci est provoquée par un antiseptique.

Beaucoup de procédés sont établis pour mesurer la croissance microbienne.

Une des premières méthodes de numération dérive directement de la technique d'isolement de KOCH: en utilisant des dilutions connues, on établit le pourcentage de colonies bactériennes qui se sont développées sur gélose en plaque. Cependant, cette technique ne peut constituer une mesure réelle de la population microbienne: entre le nombre d'individus capables de donner naissance à une colonie sur plaque de gélose, et le nombre d'individus présents dans la culture, il n'existe pas de rapport déterminé; chaque individu ne donne pas forcément naissance à une colonie.

Une autre méthode consiste à compter directement le nombre de germes au moyen de cellules compte-microbes, ou à déterminer le poids sec des microorganismes envisagés. Mais de meilleurs résultats sont obtenus par des procédés indirects, où l'on mesure les densités optiques des cultures au moyen de cellules photo-électriques: une certaine quantité de milieu de culture est prélevée et sa densité optique est mesurée au moyen d'un appareil de turbidimétrie.

Tous ces procédés de numération sont sujets à de nombreuses causes d'erreur, pouvant être dans certains cas de l'ordre de 10 à 20 %. De plus, leur utilisation oblige l'expérimentateur à faire de très nombreux prélèvements dans les cultures, s'il veut établir le plus fidèlement possible, la courbe de croissance du germe considéré. En dehors des causes d'erreur expérimentales de ces méthodes, l'inconvénient majeur réside dans le fait que des prélèvements successifs pratiqués dans la culture, la modifient en diminuant son volume total ou en risquant d'apporter des traces de substances indosables et cependant actives.

Des progrès techniques (biophotométrie) permettent d'étudier avec beaucoup de précision, la vitesse de multi-

plication des germes microbiens et de suivre pas à pas les étapes de cette croissance, grâce à l'enregistrement photométrique. Le BIOPHOTOMETRE permet non seulement l'étude du développement normal, mais aussi celle de l'influence de diverses substances, qu'elles soient favorables, ou au contraire défavorables (substances freinantes, bactériostatiques ou bactériolytiques). De plus, l'enregistrement continu fait apparaître certains phénomènes qui, soit par leur rapidité, soit par leur faible amplitude, seraient passés très probablement inaperçus en utilisant les anciennes méthodes.

Le milieu de culture ensemencé avec le microorganisme à étudier, est réparti dans des fioles spéciales à faces parallèles, placées dans une boîte calorifugée formant étuve, et constamment agitées. Un faisceau lumineux passe régulièrement devant chaque cuve, la traverse, et est reçu par une cellule photo-électrique. La cellule photo-électrique est reliée à un système d'enregistrement, de sorte que chaque valeur de l'intensité lumineuse est immédiatement transmise et enregistrée. Il s'établit ainsi automatiquement une courbe traduisant la densité optique de la culture en fonction du temps.

D'après les courbes obtenues au moyen du biophotomètre, il est donc possible de retrouver les différences de croissance signalées par MONOD (310), et de comparer le développement soit de diverses bactéries sur un même milieu, soit d'une même bactérie sur des milieux différents. Les courbes enregistrées ont une forme en "S" caractéristique: la densité optique augmente en effet progressivement avec le temps, pendant toute la durée de la phase exponentielle de croissance. Elle se stabilise ensuite et atteint la valeur maxima après un temps, variable avec chaque espèce bactérienne.

Si l'on incorpore au milieu de culture une substance dont on veut connaître l'influence sur la croissance, la courbe obtenue au biophotomètre se trouvera modifiée selon l'action du substrat; par comparaison avec la courbe témoin, nous pourrions voir s'il y a augmentation du développement, freinage, arrêt (bactériostase) ou lyse des germes en cause.

Toutes ces méthodes utilisées parallèlement, permettent l'exploration du métabolisme de diverses substances par les Bactéries. Croissance, respiration en présence de ces métabolites, mais surtout produits de synthèse ou de dégradation formés, sont plus facilement étudiés et nous permettent parfois de pénétrer plus avant dans l'étude de la chimie bactérienne.

LA CHROMATOGRAPHIE

1) GENERALITES SUR LA CHROMATOGRAPHIE:

A l'heure actuelle, la chromatographie est devenue une méthode d'application courante dans tous les Laboratoires. Elle a, en particulier, au cours des dernières années, rendu de grands services dans le domaine de la Biochimie.

La chromatographie sur papier constitue pour le microbiologiste une méthode de choix, car elle n'utilise que des quantités infimes de produits, et avec des réactifs appropriés, elle permet de déceler des traces d'éléments nouveaux dont la mise en évidence jette plus de lumière sur le métabolisme cellulaire.

HISTORIQUE:

En 1861, GOPPELSROEDER présentait dans un mémoire de la Société Industrielle de Mulhouse (280), les observations de SCHOENBEIN sur les pouvoirs très variés d'infiltration dans divers agents poreux que possèdent des corps différents. C'est ainsi qu'en plongeant quelques millimètres d'une bande de papier filtre dans une solution de tournesol rougie par de l'acide sulfurique, on voit la solution s'élever rapidement au-dessus du niveau du liquide par suite de son aspiration: trois zones se forment sur le papier: la première ne contient que de l'eau, la seconde de l'acide sulfurique dilué, et la troisième contient à la fois de l'eau, de l'acide et la matière colorante.

En 1887, GOPPELSROEDER créa le nom "d'analyse capillaire" pour désigner ce phénomène et, dans des mémoires ultérieurs (1887, 1901, 1904), insista sur le choix du papier, la nature de l'adsorbant, la hauteur de la zone immergée, la nature de l'atmosphère, le temps d'immersion, la concentration des solutions, le traitement préalable des papiers par divers produits.

Il montra aussi que la hauteur d'ascension capillaire des substances est spécifique de chaque élément.

Cette méthode eût de nombreuses applications: KYLIN, en 1927, eût souvent recours à l'analyse capillaire pour ses recherches sur les pigments caroténoïdes et F.E. MEIER, en 1929, appliqua ce procédé à l'étude des algues vertes microbiennes.

Dès 1914, Ph. LASSEUR, employant des solvants convenablement choisis, isola divers pigments microbiens et obtint la purification de quatorze corps colorés destinés à des recherches spectrales. L'analyse capillaire lui servit également en 1933 dans l'étude des solutions colorantes

utilisées en Microbiologie, et de leur fixation par les éléments microbiens (281).

Plus tard, l'analyse capillaire fut envisagée à un autre point de vue: en effet, dès que la notion de charge des Bactéries fut définitivement admise, on s'est adressé à l'analyse capillaire pour tenter l'isolement d'espèces bactériennes existant dans un mélange. Les premiers travaux datent de 1926 avec les essais de FRIEDBERGER et VIGNATI pour la séparation du Bacille typhique et du Colibacille.

Ph. LASSEUR, J.G. MARCHAL, C. MAGUITOT appliquèrent cette méthode à la séparation de divers germes chromogènes (287), (B. prodigiosus, B. caryocyaneus, B. chlororaphis), et étudièrent les facteurs capables de modifier la vitesse et la hauteur d'ascension de ces germes.

Parallèlement à ces recherches, c'est en 1906, que pour isoler de manière rigoureuse les différents pigments constituant la "chlorophylle brute", le botaniste russe Michel TSWETT, inventa la méthode dite "d'analyse chromatographique par adsorption".

Dans leur "Histoire de la Chromatographie" (1), H. WEIL et T.I. WILLIAMS, signalaient que dès 1897, D.T. DAY avait mis au point un procédé qu'il utilisait pour le fractionnement du pétrole brut. DAY (2) avait remarqué que le passage du pétrole brut sur une colonne de "lime-stone" pulvérisé, entraînait son propre fractionnement: l'huile qui apparaissait la première était plus fine, plus claire que l'huile qui la suivait. En fait, son procédé se rapprocherait plus de ce que H. FINK (282) appelle "adsorptive filtration", que de la chromatographie réelle. C'est donc à TSWETT qu'il faut réellement laisser le titre de "père de la chromatographie."

TSWETT appliqua sa méthode à la séparation des divers pigments de la chlorophylle brute.

Son procédé consistait essentiellement à filtrer le mélange de pigments végétaux en solution dans un solvant organique (éther de pétrole ou benzène), à travers une colonne d'agent adsorbant (alumine ou craie). Selon les termes mêmes de TSWETT, on obtenait "une élégante stratification pigmentaire". C'était le "chromatogramme" dont on effectuait le "développement" par lavage des différentes zones avec le solvant. Chacune d'elles était ensuite traitée par un autre solvant, pour en extraire le pigment correspondant: c'était "l'élution".

Cette méthode remarquable fut oubliée (1912 à 1931), et c'est DHERE et ses collaborateurs qui la reprirent avec succès, dans leurs études sur les caroténoïdes.

Peu à peu, la méthode de TSWETT se modifia; si elle fut à l'origine utilisée uniquement pour la séparation de corps colorés, son emploi se généralisa et elle est appliquée maintenant à des groupes chimiques très divers, et même à des composés incolores et à des sels inorganiques. Seuls les corps adsorbants et les solvants font l'objet de choix variés. MACHEBOEUF (3) considérait qu'une méthode de fractionnement efficace devait:

- 1) être réalisable avec une quantité minime de substance
- 2) permettre une caractérisation sûre, rapide et directe
- 3) être d'un emploi général et facile
- 4) ne nécessiter qu'un matériel courant.

Or, il est évident que la chromatographie par adsorption, telle que l'a décrite TSWETT, ne répond pas toujours aux conditions 1) et 4), surtout dans le domaine biochimique. Et son utilisation aurait pu de ce fait rester limitée à des domaines bien définis quoiqu'importants (industries, contrôles alimentaires, analyses diverses), si son principe n'avait été appliqué par MARTIN et SYNGE (7), puis par CONSDEN, GORDON et MARTIN (4), à une microméthode.

La microchromatographie sur papier de CONSDEN, GORDON et MARTIN (4), satisfait remarquablement aux exigences définies par MACHEBOEUF (3). Elle a permis sa propre utilisation dans le domaine biochimique, où les expériences nécessitent des microméthodes aussi sensibles et spécifiques que possible.

(A) PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE PAR ADSORPTION :

Selon P. MEUNIER (5), la méthode étant universelle, toutes les précautions résident dans le choix du solvant et des corps adsorbants.

Tout corps pulvérisé peut être essayé comme agent chromatographique, s'il répond aux conditions suivantes. Il doit:

- 1) présenter un pouvoir adsorbant suffisant vis à vis de la substance ou des substances à isoler.
- 2) ne pas réagir ni avec les substances retenues, ni avec le solvant (ne pas s'y dissoudre en particulier).
- 3) ne pas avoir une couleur voisine de celle des substances à séparer. Cette dernière condition n'a plus actuellement une aussi grande importance, du fait des récents perfectionnements apportés à cette méthode.

THEORIE SOMMAIRE:

1°- Etude physique:

Il existe un lien entre adsorbant et adsorbé, et avant de pénétrer la nature chimique de ce lien, il est nécessaire de connaître:

-la masse de substance retenue pour un poids donné de poudre;

-le volume du solvant nécessaire à l'élution.

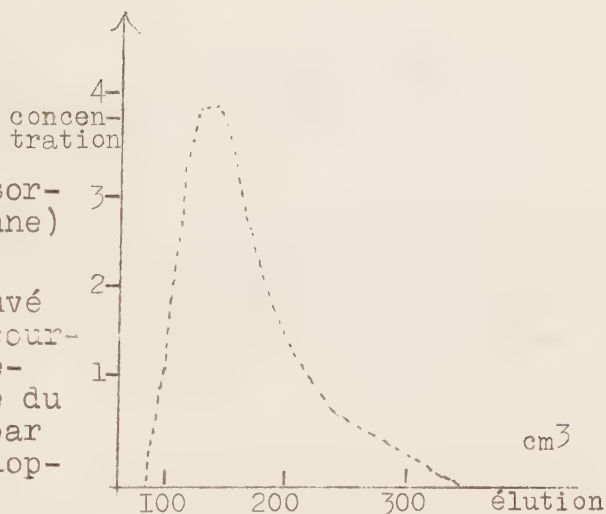
Les travaux de WILSON (6), MARTIN et SYNGE (7) et surtout ceux de WEISS (8), ont apporté une importante contribution à l'établissement des principes fondamentaux servant de base à la chromatographie.

WEISS suivait la variation de concentration d'une solution de benzopyrène filtrant à travers une colonne d'alumine ou de gel de silice. Les courbes d'élution qui représentent la concentration de la solution sortant de la colonne en fonction du volume déjà écoulé, ont une forme de cloche dissymétrique: il existe un volume V_0 , ou volume seuil, nécessaire à l'apparition dans le filtrat du corps adsorbé. Il dépend évidemment:

1) de la concentration initiale

2) de la masse de l'adsorbant (longueur de la colonne)

TISELIUS (9) a retrouvé cette même forme pour la courbe d'élution et il a entrepris l'étude expérimentale du déplacement d'un produit par un autre au cours du développement. De telles études nous enseigneront de combien les "constantes d'adsorption" de deux corps doivent différer pour rendre possible une séparation chromatographique.



2°- Etude chimique: Nature des forces d'adsorption

Sachant que toute adsorption suppose un lien entre adsorbant et adsorbé, quelle est la nature de ce lien?

HIGGINS (10) distinguait quatre groupes de forces assurant l'adsorption, mais aujourd'hui, grâce à la théorie électronique, on peut séparer deux sortes d'adsorption:

- 1) l'adsorption due à des forces ioniques
- 2) l'adsorption polaire simple.

C'est ainsi que l'ouverture d'une double liaison, en faisant naître des charges électriques, contribue à l'adsorption. De même dans un composé azoté (amines aromatiques, par exemple), l'azote peut servir de donneur d'électron sans que le carbone voisin ne prenne une charge électrique par contrecoup, et provoquer l'adsorption sur un corps convenable.

Dans une molécule complexe, présentant de nombreuses liaisons polarisables (doubles liaisons, fonctions oxygénées ou azotées), il n'y en a que quelques-unes qui jouent un rôle sur le pouvoir adsorbant, mais les autres favorisent par induction la polarisation des premières, et par conséquent, l'affinité de la molécule entière pour les adsorbants.

De toute façon, nous ne pouvons établir de remarques générales; nos connaissances actuelles sur les liaisons intermoléculaires suggèrent, pour chaque cas, une interprétation particulière.

(B) APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE PAR ADSORPTION
AUX ACIDES AMINES.

GORDON, MARTIN et SYNGE (15) en 1944, définirent la chromatographie comme un "procédé technique d'analyse par percolation d'un liquide à travers une matière finement divisée ou poreuse, sans distinction des processus physico-chimiques qui conduisent à la séparation des substances dans l'appareil".

Cette définition englobe ainsi des séparations sur colonne ou papier filtre, basées sur trois phénomènes différents: adsorption vraie, échange d'ions et partage entre deux solvants.

TISELIUS étudia l'adsorption des acides monoaminés aliphatiques sur charbon, à l'aide de l'analyse frontale (285, 286).

Dans cette méthode, la solution contenant les substances à étudier, passe à travers une colonne de charbon; à sa sortie, on mesure la concentration des substances contenues dans le filtrat au moyen d'un dispositif optique indiquant les variations de l'indice de réfraction.

De nombreux mélanges d'acides aminés neutres ont été analysés par TISELIUS et ses collaborateurs, qui obtinrent de bonnes séparations.

L'addition de pulpe de papier au charbon, permet d'y fixer la phénylalanine et la tyrosine, tandis que les acides aliphatiques ne sont pas retenus. En lavant la colonne par de l'acétone à 5%, on peut obtenir une séparation partielle de ces deux acides aminés. TURBA et ses collaborateurs (151) éluèrent la phénylalanine et la tyrosine fixées sur le charbon, par un mélange pyridine-acide acétique.

MARTIN et SYNGE (7) filtrent une solution des substances à séparer sur une colonne d'un support solide, imbibé d'un autre solvant non miscible avec le premier. Ils utilisent pour ce faire, un gel de silice imbibé d'eau et un mélange chloroforme-butanol comme phase mobile.

SYNGE (288) indique que cette méthode est limitée à des substances diffusant librement à travers le gel; elle ne peut donc pas s'appliquer à des substances colloïdales.

MARTIN et SYNGE trouvèrent que les coefficients de

partage des acides aminés N acétylés sont suffisamment variés: le repérage des zones se fait alors grâce à l'addition d'un indicateur de pH convenable (méthyl-orange) dont la couleur vire sous l'influence de l'acidité des dérivés acétylés. La colonne est lavée avec des mélanges de chloroforme - butanol à concentration croissante en butanol.

Les zones sont identifiées d'après leur hauteur et le dosage des acides ainsi séparés peut s'effectuer par la baryte.

Cette méthode a le grand avantage de ne nécessiter que peu de matériel biologique. GORDON, MARTIN et SYNGE l'appliquèrent à l'analyse des acides aminés de la laine (289.a), de la gélatine (289.b), de la tyrocidine (289.c). Mais, comme ces auteurs le signalent eux-mêmes, la préparation du gel de silice est délicate et ne réussit pas toujours (290).

SYNGE (291), puis MOORE et STEIN (292) appliquèrent alors la chromatographie de partage à la séparation des acides aminés non acétylés sur colonne d'amidon imbibé d'eau, et obtinrent d'excellents résultats. Le mouvement de certains acides aminés peut être accéléré par addition de propanol au butanol (sérine et glycocholate), ou par acidification du solvant organique (bases hexoniques) - (293, 294).

L'adsorption sur colonne - amidon ou gel de silice - fut employée également pour séparer les amino-acides sous forme de dérivés 2-4 dinitrophénylés (SANGER, 39, 40, 41, 161), ou sous forme de leurs sels de cuivre (295).

Les résines échangeuses d'ions virent également leur emploi généralisé pour la séparation des divers acides aminés. Nous citerons en particulier les travaux de GRIESBACH (146), de ENGLISS et de FIESS (296), qui étudièrent le comportement de diverses résines synthétiques envers les acides aminés, ceux de BLOCK (147) sur l'Amberlite, de FREUDENBERG (297) sur Wolfatite.

Nous reviendrons sur cette question d'une façon plus détaillée, dans le deuxième chapitre.

(C) CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

1° - Principe:

La solution à étudier est déposée sous forme de gouttes à 2 ou 3 cm de l'extrémité d'une feuille de papier filtre spécial et sur une même ligne horizontale.

Lorsque les gouttes sont sèches, on plonge l'extrémité de la feuille dans un récipient contenant le solvant choisi, saturé d'eau. Ce liquide progresse par capillarité dans le papier. L'ensemble est maintenu en vase clos, dont l'atmosphère est saturée par les vapeurs de l'eau et du solvant employé.

En cheminant au sein du papier, le liquide provoque un déplacement différent pour chaque substance déposée sur celui-ci.

Lorsque le cheminement du solvant est jugé suffisant, l'opération est arrêtée et le papier séché à l'étuve. Les substances situées à des niveaux différents sont ensuite révélées sous forme de taches ou "spots", par des réactifs convenablement choisis.

Interprétation du phénomène:

Il existerait un partage entre deux phases, l'une immobile (eau d'imbibition), l'autre mobile (liquide cheminant au sein du papier). Le papier jouerait, en somme, le rôle d'un simple support non adsorbant. Les mobilités des substances étudiées s'échelonnent comme leur coefficient de partage (α) entre l'eau et la phase organique non miscible que l'on met en oeuvre.

Si on désigne par R_f , le rapport:

$$R_f = \frac{\text{déplacement de la substance}}{\text{déplacement du solvant}} = \frac{d}{D}$$

chaque substance possède un R_f caractéristique (4).

Il ne faut pourtant pas attacher à la notion de R_f une très grande importance. Pour une même substance, le R_f varie entre autres choses, selon le papier utilisé pour la chromatographie et suivant le solvant employé. PROOM et WOIWOD (II) ne s'appuient pas uniquement sur les valeurs

du Rf pour identifier des acides aminés: toutes choses égales d'ailleurs, le Rf n'est pas rigoureusement identique d'un essai à l'autre. Pour chaque chromatogramme, il est donc préférable, comme le propose l'ACHEBOEUF (12), de faire "monter" des témoins parallèlement au milieu analysé.

Notons cependant que le cheminement chromatographique ne relèverait pas uniquement du partage entre deux phases non miscibles, l'une mobile, l'autre immobile.

On peut, en effet, obtenir de beaux chromatogrammes à l'aide de phases mobiles miscibles à l'eau et même purement aqueuses (141), ce qui démontrerait l'importance de divers facteurs, mal déterminés, qui, en plus du partage, interviendraient dans la chromatographie sur papier.

II° - Techniques générales de la chromatographie sur papier.

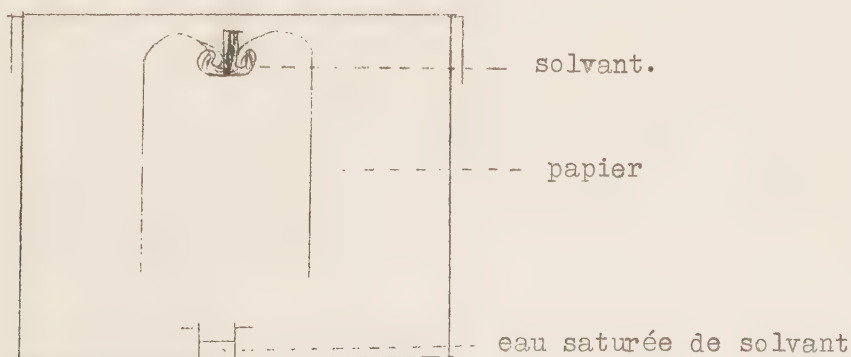
I°) Chromatographie en une seule dimension:

a) Technique descendante:

Cette méthode fut la première technique de chromatographie sur papier, adoptée par CONSDEN, GORDON et MARTIN (4).

La phase mobile chemine de haut en bas dans le papier qui pend librement et dont l'extrémité inférieure est dentelée afin de permettre un bon écoulement du solvant. L'opération est arrêtée lorsque le solvant atteint l'extrémité du chromatogramme.

Cette technique nécessite un appareillage spécial, assez délicat, répondant au schéma suivant:



b) Chromatographie à écoulement continu:

Cette méthode (I3) est la même que la technique descendante mais on laisse le solvant s'écouler par les dents de scie du papier pendant un temps variable. Ce procédé présente un intérêt pour des substances peu mobiles (bases hexoniques des acides aminés par exemple) qui sont ainsi mieux séparées. Si l'on veut calculer le Rf du spot obtenu, on se base sur des produits purs dont on a fait courir le chromatogramme parallèlement à la substance à analyser. Si l'on pose:

$$\begin{aligned} \text{Rf (x)} &= \text{Rf inconnu} \\ \frac{dx}{dt} &= \text{déplacement de la substance témoin de} \\ &\quad \text{Rf connu Rf(t)} \\ dx &= \text{déplacement de la substance inconnue} \end{aligned}$$

On a

$$\text{Rf(x)} = \frac{dx}{dt} \text{ Rf(t)}$$

c) Technique ascendante:

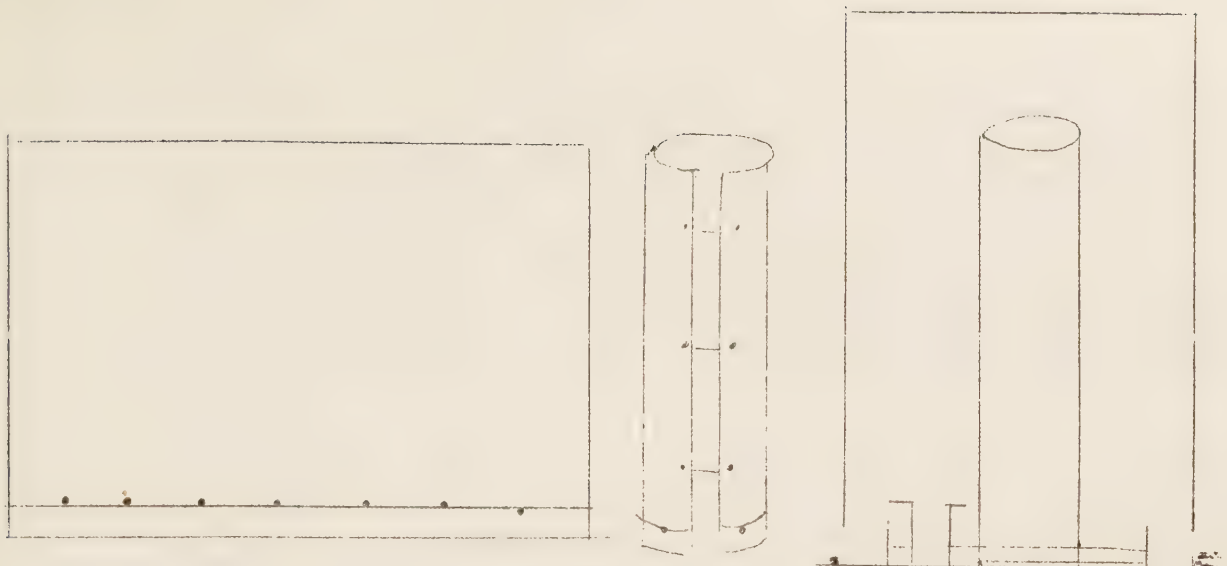
C'est cette technique préconisée par WILLIAMS et KIRBY (I4) que nous avons utilisée dans nos essais.

Le papier sur lequel la solution à analyser a été déposée, est enroulé en cylindre et attaché par des noeuds de fil.

L'extrémité inférieure du papier est en contact avec une phase solvante convenable qui s'élèvera par capillarité.

Le tout est maintenu, comme dans toute chromatographie, en vase clos, afin d'éviter tout courant d'air et toute variation de température, susceptibles d'avoir des répercussions sur la montée du solvant; l'atmosphère est saturée par les vapeurs de l'eau et du solvant utilisé.

Cette technique ne nécessite pas un matériel spécial: il suffit d'un couvercle de boîte de Pétri pour contenir le solvant et d'un petit béccher pour l'eau saturée de solvant, le tout étant recouvert d'une grande cloche en verre. La seule précaution à prendre est de ne pas déposer les premières gouttes de la solution à analyser trop près des bords de la feuille: on aurait alors un "effet de bord" qui modifie non seulement la forme du spot, mais surtout la hauteur normale à laquelle il doit se former.



La durée de l'opération est variable. Dans certaines de nos expériences, 16 à 18 heures de développement ont été largement suffisantes pour obtenir une excellente séparation des spots, surtout lorsque le solvant employé était le phénol ammoniacal saturé d'eau. Mais nous avons remarqué qu'un développement poussé durant 30 et même 40 heures donnait de meilleurs résultats quant à la séparation des spots d'acides aminés, surtout des acides aminés "lents" tels que les bases hexoniques.

Le calcul du R_f devenait ainsi impossible, car le front du solvant avait dépassé largement l'extrémité du papier; mais cela n'avait pour nos expériences que peu d'importance, puisque nous faisons courir chaque fois des témoins parallèlement à nos solutions à analyser (12). Ce procédé correspond à la technique utilisée par FOWDEN (20) et aux observations relatives à la chromatographie de l'histamine par PENEAU (22) et KOWKABASSY (21).

d) Chromatographie circulaire:

La chromatographie circulaire signalée par de nombreux auteurs (24, 25, 26, 27, 28, 29) présente beaucoup d'avantages. Le développement d'un chromatogramme peut s'effectuer en deux à cinq heures et on obtient par ce procédé, une excellente séparation.

Elle consiste à appliquer au centre d'une feuille de papier à chromatographie de forme circulaire, la solution à analyser. Sur la goutte centrale, on fait arriver le solvant au moyen de différents artifices. Nous

citerons celui de ZIMMERMAN (27) qui donne d'excellents résultats. Le chromatogramme est maintenu entre les bords de deux cristallisoirs; on découpe une languette dans le papier et on la fait plonger dans le solvant choisi. Ce dernier chemine par capillarité à travers la languette de papier, puis gagne le chromatogramme lui-même, entraînant avec lui les substances à analyser. Celles-ci se déplaceront suivant un cercle, dont la distance au point de départ (centre), sera caractéristique de chaque substance.

Nous noterons également un autre procédé de chromatographie circulaire, celui de CARLES (311) qui utilise un tube capillaire pour conduire le solvant au centre du papier. Il règle le débit et le contact entre le solvant et le papier au moyen d'une fine épingle de verre ou de métal.

La chromatographie circulaire connaît de nombreuses applications: GIRI et ses collaborateurs (30) l'utilisent pour l'étude de la transamination chez les plantes; TARA RAO pour l'identification et le dosage de l'urée dans l'urine humaine (par chromatographie directe, sans extraction préalable) (31).

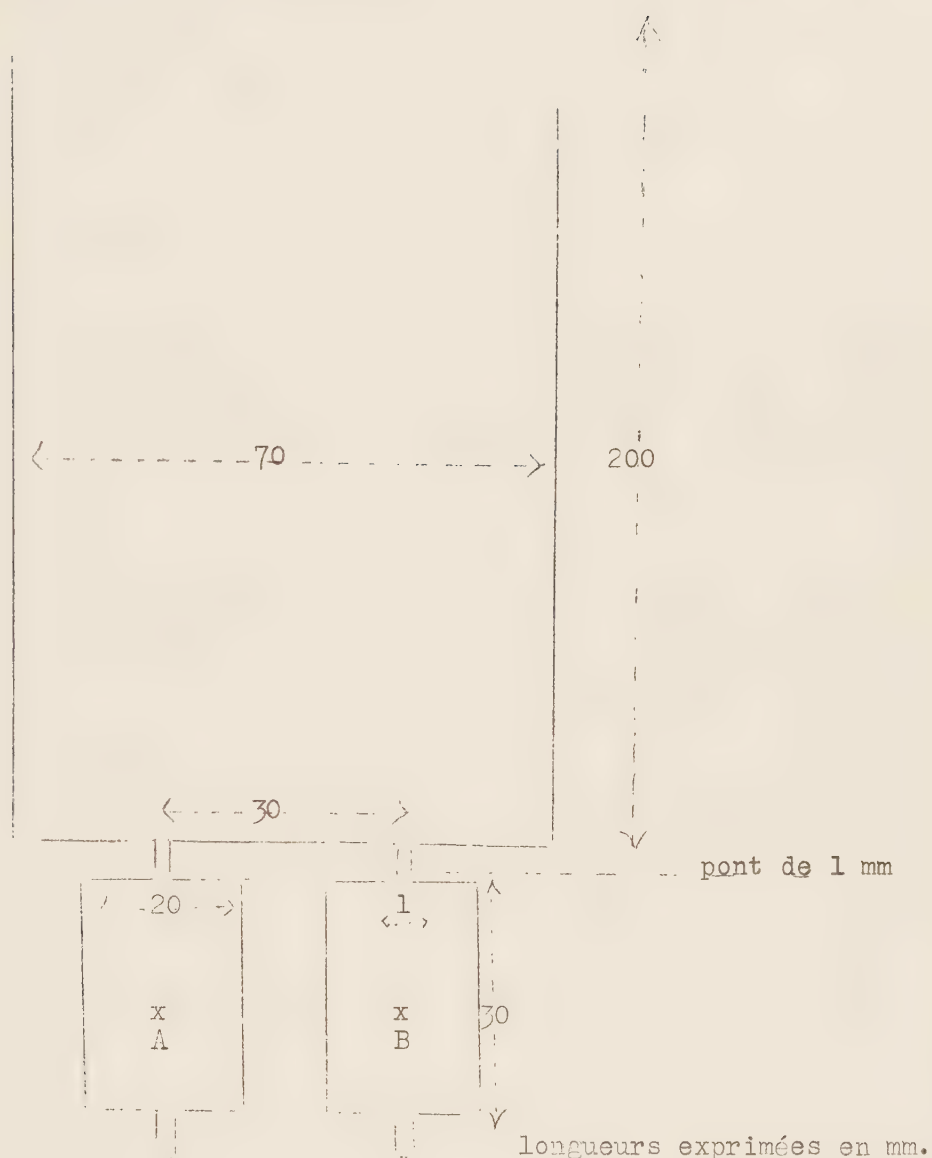
e) Chromatographie en arcs de cercles:

=====

J.G. MARCHAL et T. MITTWER (142) proposèrent en 1951 une modification à la technique générale de chromatographie sur papier, en décrivant une méthode dite en "arcs de cercles".

En 1953, J.G. MARCHAL et R. BENE¹ (143) donnèrent une technique encore plus simple, permettant une identification facile des acides aminés.

Il suffit de découper dans du papier à chromatographie des bandes spéciales selon le schéma suivant:



Le liquide à analyser est placé en A tandis qu'en B, on dépose une goutte d'un mélange connu d'acides aminés qui servira de témoin. Les papiers sont alors immergés dans un solvant approprié (en général butanol-acide acétique) en y trempant seulement la languette terminale. Le temps de développement peut être variable: 12 heures pour les amino-acides de Rf élevé, 18 heures et jusqu'à 24 heures pour les autres. Pour la cystéine, la cystine et la lysine, substances migrant très lentement, il faut même prolonger l'opération plus de 24 heures.

Après séchage et révélation à la ninhydrine, les acides aminés sont répartis en arc de cercle dont le rayon est fonction du Rf de l'acide-amino correspondant.

Leur identification se fait facilement par comparaison avec les témoins, "montés" dans les mêmes conditions, sur la languette B.

2) Chromatographie en deux dimensions:

Cette technique consiste à développer dans une direction un chromatogramme avec un solvant défini, puis à traiter le même papier dans une direction perpendiculaire à la première avec un autre solvant. Elle procède des mêmes techniques que la chromatographie en une dimension, ascendante ou descendante.

La chromatographie à deux dimensions a été utilisée par de nombreux auteurs (16, 17, 18, 19, 23, 4, 12). Toutefois, nous noterons que de bons résultats sont plus difficiles à obtenir et nécessitent plus de soins que pour la chromatographie à une seule dimension.

Les appareils nécessaires sont plus délicats, surtout dans l'emploi de la technique ascendante, et il est plus difficile d'identifier les substances inconnues: on ne peut en effet monter sur le même papier un chromatogramme de la solution à analyser et des témoins.

Malgré tout, cette technique reste très employée car elle permet une séparation excellente de tous les spots chromatographiques.

III°- Papiers utilisés:

L'un des principaux facteurs ayant une influence sur la chromatographie est bien le papier utilisé.

Certains papiers sont plus rapidement mouillés par capillarité que d'autres; certaines substances contenues dans la trame cellulosique sont capables de réagir lors de la révélation; la fluorescence de certains composés peut varier selon la nature du papier employé (32). On voit donc combien est important le choix du papier: certains auteurs utilisent le papier Whatman n° 1, d'autres le papier Schleicher et Schull.

Dans nos expériences, nous avons utilisé du papier Schleicher et Schull, fourni par les Etablissements "Labo-Moderne" (6, rue de la Vrillière, Paris 1^o), sous la référence n^o 2043 A.

De toute façon, chaque résultat obtenu en chromatographie, doit indiquer les conditions dans lesquelles ce chromatogramme a été réalisé:

- temps de développement
- solvant utilisé
- papier employé.

Le plus souvent le papier est utilisé tel quel, sans traitement préalable. Mais MUNIER (33) utilise pour les alcaloïdes et les bases azotées biologiques, un papier traité préalablement par des sels.

Pour la chromatographie sur papier des acides gras, P. SAVARY (34) emploie un papier silicôné. HAGDAH et TISELIUS (35) recommandent pour séparer les amino-acides et les peptides, des papiers imprégnés d'une solution de phosphates mono et disodiques. Enfin, F. PATTE (139) recommande l'emploi d'un papier imbibé d'une solution de cyanure de potassium à 10 % pour le dosage sélectif de la vitamine B₁₂: dans ce cas le cyanure n'a pas seulement un rôle passif, mais il réagit et l'auteur obtient ainsi une cyanuration homogène des différentes cobalamines pouvant se rencontrer dans un milieu de culture microbienne.

IV^o - Protocole général:

Bien que le protocole général puisse varier dans certains détails, (choix du solvant, temps de développement, révélation), il reste le même dans ses grandes lignes quelle que soit la substance à analyser (acides aminés, sucres, corps cétoniques, acides organiques).

On distingue les étapes suivantes:

- 1^o- dépôt des gouttes de la substance à chromatographier sur le papier
- 2^o- développement du chromatogramme dans le solvant et l'atmosphère choisis, pendant un temps déterminé.

3°- séchage du chromatogramme

4°- révélation.

V° - Applications de la chromatographie sur papier à la
Microbiologie:

La méthode initiale de TSWETT, après les modifications de CONSDEN, GORDON et MARTIN et de nombreuses adaptations, est une méthode remarquable, possédant une latitude d'utilisation de plus en plus grande.

De nombreux auteurs ont rassemblé dans d'intéressantes publications toutes nos connaissances actuelles sur la chromatographie. Nous ne manquerons pas de citer à ce sujet, les ouvrages de F. CRAMER (36) et de I.M.HAIS et K. MACEK (140) et surtout ceux de E. LEDERER (283) et M. LEDERER (284).

Les applications de la chromatographie à la Biochimie et à la Clinique, abondent: citons par exemple, l'étude des acides aminés urinaires et sanguins (18), celle de l'urée (30), la séparation des acides cétoniques du sang et de l'urine humaine (37, 206, 207, 208, 209, 210), et les travaux de M. KACHEBOEUF et R. MUNIER sur les alcaloïdes et les bases azotées biologiques (38,220).

La chromatographie a permis également d'éclaircir la constitution de nombreux composés peptidiques ou protéiniques complexes: tels sont les travaux de SANGER sur l'insuline (40, 41), ceux de CONSDEN, GORDON et MARTIN (42), de SYNGER (43) et de HARRIS (44) sur la gramicidine. On sait que la laine contient vingt et un amino-acides différents (45, 46, 289); on connaît maintenant la constitution de la clupéine (47) et celle des composés toxiques de l'Amanita vulgaris (48). Innombrables sont les travaux exécutés et menés à bien grâce à cette méthode et les citer tous devient de plus en plus difficile en raison de l'application quasi universelle du procédé.

La Microbiologie elle-même procure à la chromatographie un champ immense d'applications possibles.

L'étude du métabolisme bactérien par cette méthode

est à l'origine de très nombreux travaux: métabolisme des acides aminés (49, 50, 51, 52, 53, 54) métabolisme intermédiaire (55, 56, 57, 58, 59, 60), étude de la transamination chez les Bactéries (61, 62, 30).

L'identification des produits d'un métabolisme devient de ce fait plus facile: c'est ainsi que peut être prouvée la présence d'acide gamma-aminobutyrique dans des cultures de *Esch.coli* ou de *Shigella paradysenteriae* (63), et découverte la présence d'un nouvel acide aminé, l'acide diaminopimélique, chez *Corynebacterium diphtheriae* et de nombreuses autres bactéries (64, 65, 69, 70).

La chromatographie peut s'appliquer à certains tests microbiologiques, tels que la recherche de la décarboxylase, de l'acide glutamique ou de l'acide aspartique, ou bien encore la recherche de la production d'amines par les *Proteus* (66, 67).

Elle peut servir de moyen de contrôle pour la fabrication de produits du métabolisme, par exemple pour obtenir des peptones toujours identiques à elles-mêmes.

Enfin, cette nouvelle technique est encore applicable à des substances telles que la pénicilline (GOODALL et LEVI - 298), la streptomycine (HORNE et POLLARD - 299), et même à la détermination de l'activité de tout antibiotique (68).

Le domaine de la chromatographie et plus particulièrement de la chromatographie sur papier, s'étend depuis les amino-acides jusqu'aux molécules les plus complexes. Elle englobe des corps tels que les vitamines, les hormones, les stéroïdes, les nucléosides et acides nucléiques et même des corps minéraux (71).

C'est non seulement une technique capable de s'adapter à bien des cas d'expérience, mais encore, ce qui est loin d'être négligeable, une technique sensible et spécifique sous certaines conditions.

Il ne faut pas croire cependant que tous les problèmes scientifiques soient justiciables de cette méthode. Malgré tout, en coopération avec les méthodes de la chimie classique et moderne, elle doit être considérée comme un des moyens techniques le plus particulièrement adapté à la recherche en chimie organique et biologique.

2) APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER A LA SEPARATION ET A L'IDENTIFICATION DES ACIDES AMINÉS

Parmi les trois groupes qui forment l'ensemble des constituants de la matière vivante, celui des protides est le plus complexe. Sous le terme de protides, on englobe les acides aminés naturels eux-mêmes, et tous les composés donnant par hydrolyse, totalement ou partiellement, des acides aminés.

La chromatographie sur papier fut appliquée tout d'abord aux acides aminés: c'est une méthode beaucoup plus rapide et commode que celles jusqu'ici connues pour la séparation des amino-acides (il en existait une en particulier, par l'intermédiaire de leurs sels de cuivre). On comprend donc facilement la répercussion de l'emploi de ce nouveau procédé, qui permet non seulement l'étude des acides aminés, mais aussi celle de la composition et de la structure des peptides et des protides, puisque l'hydrolyse de tels composés aboutit à un mélange d'acides aminés.

Nous ne traiterons ici que de la chromatographie sur papier des amino-acides et nous envisagerons successivement:

- 1) la préparation de la solution à chromatographier
- 2) la préparation du chromatogramme
- 3) les solvants utilisés
- 4) la révélation
- 5) l'application au dosage des acides aminés
- 6) les méthodes spéciales de chromatographie

I°°- PREPARATION DE LA SOLUTION A CHROMATOGRAPHIER:

=====

Il arrive bien souvent que les résultats d'un chromatogramme soient illisibles ou même faussés: la sensibilité de la méthode rend son application délicate; il est nécessaire de prendre certaines précautions. En règle générale, même en solution pure, les acides aminés à analyser ne doivent pas être en trop forte concentration: il existe une concentration optima au-dessus de laquelle le spot formé est bien trop gros et la mobilité influencée. Le plus souvent même, on assiste à la formation de "queues" derrière chaque spot, ce qui rend la lecture du chromatogramme impossible.

Enfin, le rôle des substances étrangères pouvant

être présentes dans une solution à analyser, est loin d'être négligeable.

- LES SELS MINÉRAUX, s'ils sont en quantité supérieure à 1%, peuvent modifier complètement l'aspect d'un chromatogramme: en effet, il ne faut pas oublier que la chromatographie est également applicable aux anions et aux cations minéraux (71).

Les ions se comportent comme des particules hydrophiles qui attirent l'eau et de ce fait, bouleversent l'équilibre de saturation des phases solvantes mises en jeu, entraînant ainsi une modification de la chromatographie.

CONSDEN et GORDON étudièrent l'effet des sels sur la chromatographie (75) et remarquèrent l'apparition de spots jaunes sur des chromatogrammes traités à la ninhydrine: ces spots correspondent à certaines zones du papier qui, sous l'effet des ions, deviennent acides ou alcalines. L'alcalinité empêcherait parfois le complet développement des spots par la ninhydrine, entraînant ainsi une révélation incomplète et même impossible de certains amino-acides tels que l'alanine, la glycine, la thréonine et la tyrosine.

Il faut donc éliminer les sels, et pour cela traiter la solution à analyser par divers procédés que nous envisagerons plus loin.

- LES LIPIDES sont eux aussi à éliminer avant la chromatographie: ils peuvent provoquer le déplacement et la déformation des spots.

- Enfin, la solution à chromatographier ne doit pas contenir un gros excès de substances étrangères à celles que l'on veut étudier, afin d'éviter tous ennuis dans la caractérisation de ces substances, par interférence, lors de la révélation.

A) Purification de la solution à analyser: Dessalage

De nombreux procédés ont été proposés dans ce but. Certains sont longs et semblent augmenter la durée des manipulations: mais il ne faut pas perdre de vue que ces procédés sont indispensables pour l'obtention de beaux chromatogrammes.

1°- Par précipitation

Cette méthode est surtout valable pour les produits d'hydrolyse des protéines par l'acide sulfurique.

Un simple traitement par la baryte, suivi d'une filtration ou d'une centrifugation peut servir à éliminer suffisamment les ions (305).

2°- Dessalage électrolytique

Le dessalage peut être obtenu au moyen de l'appareil à cathode mobile de mercure, de CONSDEN, GORDON et MARTIN (4.76) modifié par ACHER, JUTISZ et FROMAGEOT (300).

Cet appareil est constitué par une cuve à électrolyse réfrigérée, dont le fond est recouvert d'une couche de mercure servant de cathode; le mercure est renouvelé constamment sous l'influence d'eau sous pression. L'opération de dessalage doit durer de 15 à 20 minutes.

Il est possible, par cette technique, de se débarrasser de toute trace de sels minéraux sans perte sensible en amino-acides. Il est recommandé cependant d'éliminer auparavant de l'échantillon à dessaler, l'ammoniac pouvant s'y trouver et qui, susceptible de s'amalgamer, serait gênant pour la conduite de l'opération.

Malgré les perfectionnements apportés, ce procédé présente de nombreux inconvénients: tout d'abord, il nécessite une assez grande quantité de liquide à analyser, ce qui enlève déjà un des avantages de cette méthode, car nous disposons généralement de très peu de matériel.

Mais le principal inconvénient est celui signalé par STEIN et MOORE (77): cette méthode peut être à l'origine de transformations. C'est ainsi que dans ces conditions, l'arginine peut être dégradée plus ou moins complètement en ornithine.

3°- Emploi des résines échangeuses d'ions

Le principe de l'échange d'ions fut découvert en 1850 par un Pharmacien de York, nommé SPENCE. Ce dernier constata en effet, qu'en faisant passer de l'eau à travers une couche d'argile mêlée de sulfate d'ammonium, le percolat contenait non du sulfate d'ammonium, mais du sulfate de calcium: l'ion ammonium était retenu sous forme de sel insoluble.

WAY (306) parvint à synthétiser des silicates identiques à ceux de l'argile naturelle et GANS (307) en 1905, reprit l'étude de la synthèse des silicates d'aluminium et de leur application à l'adoucissement de l'eau. Ce furent ADAMS et HOLMES qui préparèrent les premières résines échangeuses artificielles par condensation avec le formol d'acides phénol-sulfoniques (I44) ou de polyamines.

Actuellement, la gamme des résines artificielles, très étendue, permet leur emploi dans des domaines variés et nombreux, allant de l'industrie au laboratoire, en passant par la thérapeutique.

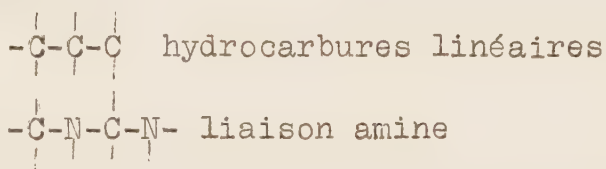
Propriétés fondamentales:

Une résine échangeuse d'ions doit:

- 1) être complètement insoluble dans l'eau, l'alcool, la glycérine et autres solvants pouvant être utilisés dans un échange.
- 2) résister à l'hydrolyse, à tous les pH et toutes les températures.

structure:

Les résines échangeuses d'ions répondent à deux types de chaîne:



A ce squelette sont fixés des groupes ioniques capables de produire l'échange, groupes variables selon qu'il s'agit d'une résine à échangeur de cations ou d'anions.

Le choix du type dépendra de l'application de l'échangeur; pour les cations, Amberlite, Dowex ou Zeo Karb, par exemple.

Technique:

Le plus souvent, on opère dans des colonnes échangeuses (I45). La solution à traiter traverse de haut en bas une colonne remplie de l'échangeur, durant un temps déterminé.

Ce dernier est ensuite régénéré par le passage d'une

solution convenable: à chaque résine correspond un protocole différent.

Les résines échangeuses d'ions peuvent donc être utilisées dans des domaines très variés.

Tout d'abord, elles peuvent être utilisées pour la séparation des acides aminés: GRIESBACH (I46) fut le premier à indiquer une méthode à l'aide de résines synthétiques. Actuellement, de nombreuses techniques sont proposées (I47.I48) et permettent la séparation d'acides aminés variés:

- glutamine et arginine (I49)
- arginine et histidine (I50)
- tryptophane et autres amino-acides (I51)
- leucine, histidine, lysine, arginine (I48.I52)
- leucine, acide glutamique, méthionine (I53).

Mais surtout les résines échangeuses d'ions rendent de grands services pour le dessalage des solutions destinées à la chromatographie, évitant ainsi l'effet de sels si gênant.

Parmi les nombreuses méthodes utilisant les résines, nous retiendrons surtout celles utilisant l'Amberlite ou la Permutite (I54, I55). La méthode de BOULANGER et BISERTE (79) que nous exposons dans le paragraphe suivant, associe à la fois le dessalage au moyen de Permutite et l'adsorption des amino-acides sur la résine échangeuse d'ions.

B) Extraction des acides aminés:

Le plus souvent le dessalage n'est pas suffisant et il est nécessaire d'effectuer une véritable extraction des acides aminés du liquide où ils se trouvent.

Certains procédés associent à la fois une déprotéinisation par ultra-centrifugation (DENT, 83) ou plus simplement par l'alcool (AGREN, I69), et la délipidation par l'éther, avec l'emploi de résines échangeuses d'ions (BOULANGER, 79).

Le principe reste le même: après une suite de manipulations plus ou moins complexes, on obtient finalement une solution contenant les acides aminés et d'où toute substance pouvant gêner la chromatographie ultérieure, a été éliminée complètement ou presque.

1°- Technique de BOULANGER et BISERTE (79):
=====

La solution à traiter est tout d'abord déprotéinisée en la traitant par 5 fois son volume d'alcool éthylique contenant 1% d'acide chlorhydrique concentré (V/V). Après centrifugation, l'alcool est éliminé sous pression réduite et à basse température. Le liquide résiduel est dilué au moyen d'une solution à 1% d'acide acétique, puis filtré.

Le filtrat est passé directement sur une colonne de Permutite 50 de 16 mm de diamètre sur 20 à 30 cm de hauteur: le passage doit s'effectuer très lentement (10 à 20 gouttes par minute).

La colonne est ensuite lavée par 200 à 300 ml d'eau distillée et on déplace les acides aminés qui s'y sont fixés par une solution normale d'ammoniaque. Cette dernière est recueillie, puis évaporée sous pression réduite, et le résidu, repris par de l'eau distillée, est prêt à être chromatographié.

La colonne est ultérieurement régénérée, par de l'acide chlorhydrique 2N, puis lavée à l'eau distillée jusqu'à résistivité constante du liquide effluent.

2°- Technique de LISSITSZKY-CESAIRE-MASSONET (82):
=====

La solution à traiter (1 ml dans le cas de sérum ou de plasma) est placée sur un rectangle de papier à chromatographie et séchée dans un courant d'air: on élimine ainsi l'eau.

Le papier sec est ensuite découpé et placé dans une fiole contenant 25 ml d'acétone acide (1% d'acide chlorhydrique concentré. On agite mécaniquement durant 1 heure.

La solution acétonique est alors centrifugée puis l'acétone éliminée par distillation sous vide à une température inférieure à 60°C.

Le résidu est repris par trois fois 3 ml de chloroforme, en laissant en contact 15 minutes (délipidation); le chloroforme et les parois du ballon sont lavés par de l'eau acide qui est ensuite concentrée sous vide.

Le résidu repris par un peu d'eau distillée, fournit une solution prête à être chromatographiée.

3°- Technique de MACHEBOEUF (12):
=====

C'est cette technique que nous avons utilisée: elle donne d'excellents résultats, sans perte appréciable d'aminos.

acides.

La solution est tout d'abord déprotéinisée par de l'alcool éthylique (dans la proportion de 1/5 environ), et centrifugée.

Après évaporation sous vide pour éliminer l'alcool et une grande partie de l'eau, le résidu à peu près sec est repris par 0,5 ml d'eau, puis par 5 ml d'éther. Ce solvant dissout les lipides; on l'élimine par décantation et l'on répète trois fois cet épuisement par l'éther.

Les solutions éthérées sont rassemblées, puis agitées avec 1 ml d'eau acidulée par de l'acide chlorhydrique, afin de récupérer les traces d'amino-acides ayant pu être entraînées par ce solvant.

La liqueur acide est ensuite réunie au résidu délipidé et l'ensemble est évaporé sous vide jusqu'à siccité.

Le résidu est traité à quatre reprises différentes par un mélange d'acétone et d'acide chlorhydrique 10 N (100 ml d'acétone et 1 ml de HCl-10N). L'acétone acide doit rester chaque fois en contact avec l'extrait sec un minimum de 3 heures; il dissout les acides aminés à l'exception de la majeure partie des sels et de toutes les impuretés gênantes.

Les solutions acétoniques sont réunies et évaporées sous vide jusqu'à siccité, afin d'en éliminer l'acétone et l'acide chlorhydrique.

Le résidu est repris par quelques gouttes d'eau distillée, puis chromatographié.

Cette méthode permet donc, non seulement d'extraire les acides aminés, mais aussi de les concentrer.

II⁰⁰ - PREPARATION DU CHROMATOGRAMME.

Selon la technique générale, la solution prête à être chromatographiée, est "appliquée" en gouttes, le long de la ligne de départ. On recommence l'application autant de fois qu'il est nécessaire, en laissant sécher la goutte entre deux opérations.

Nous avons remarqué qu'une application, au moyen d'un tube capillaire sous la forme d'un trait fin de 1 cm à 1,5 cm de long sur 1 à 2 mm de large, nous donnait une bien meilleure séparation des différents spots, que ne le permettait la technique en gouttes.

Cette technique en "traits" n'est cependant excellente qu'avec le butanol-acétique ou le butanol-formique employés comme solvants: elle ne donne pas de bons résultats avec le phénol.

Signalons qu'une méthode semblable fut utilisée par plusieurs auteurs (NOVELLIE - HEDEN , 87, 88, 89): ces auteurs appliquaient la solution à analyser en un seul trait le long de la ligne de départ, mais non par petits traits successifs. Cette méthode a l'avantage de déposer ainsi plus de matériel sur le chromatogramme; chaque acide aminé se déposera en longues bandes qui, si elles doivent être soumises à l'élution, fourniront plus de matériel pour des expériences ultérieures (vérifications diverses, réactions chimiques).

Quand les applications de la solution à étudier sont terminées, le chromatogramme sec est alors enroulé en cylindre et monté selon la technique générale, dans le solvant choisi.

III^{oo} - SOLVANTS UTILISES.

Le choix du solvant est important, car de lui va dépendre la séparation de différents groupes d'acides aminés. Il est toujours recommandé de monter un chromatogramme dans différents solvants: la confrontation des résultats permet alors une identification plus certaine des acides aminés.

Il existe de nombreux systèmes de solvants: toute combinaison est possible pour obtenir les phases solvantes nécessaires.

Nous ne citerons que les plus importants et ceux que nous avons nous-même utilisés.

I) Phénol:

Le phénol est un des solvants les plus couramment employés.

Certains auteurs recommandent l'emploi d'un phénol très pur, obtenu par redistillation sous pression réduite de phénol commercial, en présence d'aluminium et de bicarbonate (85, 91, 92).

Pour notre usage, nous avons utilisé un phénol cristallisé, très pur, sans redistillation préalable.

En général, on utilise un phénol saturé d'eau contenant 0,1% d'ammoniaque, dans une atmosphère d'eau saturée de phénol et contenant soit du cyanure de sodium ou 3% d'ammoniaque (19), soit 0,6% d'ammoniaque (20). Le phénol, les réactifs, le papier peuvent contenir des traces de métaux qui déterminent l'apparition de taches colorées au niveau du front du solvant: le cyanure ajouté à l'eau saturée de phénol, forme des complexes avec ces métaux, par libération d'acide cyanhydrique, et évite ainsi l'apparition des taches colorées; le cyanure retarde également l'auto-oxydation du phénol.

Notons que Mac FARREN (93) utilise, surtout pour la chromatographie des bases hexoniques, un phénol saturé de tampon phosphate-acide citrique de pH = 4 et de composition suivante:

phosphate disodique	0,067 M	15,42 ml
acide citrique	0,067 M	12,9 ml

Le phénol donne des Rf très élevés; il permet d'excellentes séparations, celles de la glycine et de la sérine par exemple; l'arginine a une mobilité très forte en phénol, tandis que dans le butanol, cet acide aminé possède un Rf assez bas.

Le seul inconvénient du phénol est son auto-oxydation rapide (malgré l'addition de cyanure), ce qui nécessite son fréquent renouvellement.

2) Butanol acétique:

Plusieurs formules furent données pour ce solvant très courant. Nous avons utilisé celle de PARTRIDGE (85).

N butanol	40 ml
acide acétique	10 ml
eau	50 ml

Ce solvant donne des Rf assez bas, mais une séparation excellente, surtout si le temps de développement est poussé à 30 ou 40 heures, au lieu du temps habituel de 16 à 18 heures.

3) Solvants à la collidine:

On utilise, soit la collidine pure saturée d'eau, soit un mélange collidine - lutidine à parties égales,

également saturé d'eau (19).

Ces solvants donnent une excellente séparation: ils sont malheureusement d'un emploi délicat, non seulement à cause de leur odeur, mais surtout parce qu'ils sont loin d'être dénués de toute toxicité.

4) Alcool amylique tertiaire saturé d'eau:

En atmosphère de diéthylamine, l'alcool amylique tertiaire saturé d'eau est préconisé par WORK (86) et FOWDEN (20).

Nous n'avons monté que quelques chromatogrammes dans ce solvant et nous l'avons rapidement abandonné. Bien que donnant des Rf très bas pour certains amino-acides, la séparation est assez bonne, mais elle nécessite environ trois jours de développement.

De plus, l'alcool amylique tertiaire est d'un prix de revient par trop élevé pour permettre d'effectuer de très nombreuses expériences.

5) Butanol et acide formique:

Ce nouveau solvant fut préparé selon WIGGINS (90).

On laisse une heure au réfrigérant à reflux le mélange suivant:

N butanol	600 ml
acide formique	50 ml
eau	50 ml

Après refroidissement, on ajoute 300 ml d'eau et on laisse décanter. On utilise comme solvant la partie supérieure du mélange.

6) Autres solvants:

Nous citerons entre autres solvants:

- Butanol tertiaire 4p./ alcool méthylique 5p./eau 1p.(94)
- Alcool méthylique 90 p./ ammoniaque 2p./ eau 8 p.
- Isopropanol 80p./ eau 18p./ ammoniaque 2p.
- Acide iso-butyrique 80p./ eau 20p./ (95).

Pour la chromatographie en deux dimensions, on utilise surtout les trois systèmes suivants:

- (96) butanol 40 p./ acide acétique 10p./ eau 50p.
phénol saturé d'eau contenant 0,1% d'ammoniaque
- (19) phénol saturé d'eau contenant 0,1% d'ammoniaque
collidine-lutidine à parties égales et saturées d'eau
- (4) phénol aqueux à 80%
collidine saturée d'eau.

Dans nos expériences, nous n'avons jamais utilisé la chromatographie en deux dimensions.

IV^{oo} - REVELATION.

=====

Une fois le chromatogramme développé dans le solvant choisi, puis séché, il faut révéler chaque spot formé par les différents amino-acides contenus dans la solution à analyser.

Nous envisagerons successivement:

- 1) Fluorescence
- 2) Réaction générale: la ninhydrine
- 3) Réactions spéciales et spécifiques
- 4) Conservation des chromatogrammes.

1) FLUORESCENCE:

Si la fluorescence à l'ultra-violet est un moyen de révéler certains corps comme les acides nucléiques, elle n'est guère utilisable pour déceler les acides aminés. Seuls sur 20 acides aminés, sont fluorescents par eux-mêmes, le tryptophane, l'histidine et la citrulline.

PHILIPS montra (97) qu'il pouvait y avoir formation de composés fluorescents entre les amino-acides et la cellulose du papier par chauffage: la température doit alors être inférieure à 37°C. Si la température est plus élevée, l'intensité de la fluorescence décroît en fonction de la température.

JOHANSEN et NICKERSON (98) suggèrent qu'il y aurait entre les acides aminés et les sucres réducteurs une réaction semblable à la "browning reaction" observée par interaction de ces substances à l'autoclave, et aboutissant à la formation de composés plus ou moins fluorescents.

GRAHAM et ses collaborateurs (99) montrèrent que quinze amino-acides réagissent avec le glucose à l'autoclave et donnent des substances fluorescentes, le glucose agissant comme une source de groupements aldéhydiques.

On pense donc que la fluorescence des acides aminés et de certains composés azotés (peptides, amines), sur papier filtre, serait due à une réaction avec les groupements aldéhydiques dérivés des chaînes modifiées de la cellulose du papier: WOIWOD (100) constata en effet que des acides aminés ne présentant aucune fluorescence par eux-mêmes, le devenaient par simple addition de poudre de cellulose et chauffage à 80°C. De même, PATTON et ses collaborateurs (101), insistèrent sur le rôle joué par la cellulose dans la fluorescence lors de la chromatographie sur papier. Ces mêmes auteurs attirèrent l'attention (102) sur le fait que ces combinaisons fluorescentes incolores pourraient bien représenter des degrés successifs de polymérisation de précurseurs incolores de pigments bruns (mélanoïdes).

De toute façon, la fluorescence ne peut être un moyen général de révélation des chromatogrammes d'acides aminés. Les fluorescences observées ne sont pas toujours identiques à elles-mêmes, dépendant en particulier de la cellulose, donc du papier employé pour la chromatographie.

2) REACTION A LA NINHYDRINE:

La réaction à la ninhydrine est celle utilisée généralement pour révéler tous les chromatogrammes des acides aminés.

Si le procédé général d'application est toujours le même (pulvérisation de la solution de ninhydrine et chauffage à l'étuve vers 100 à 105°C jusqu'à apparition des spots rouge-violacé), la formule de la solution de ninhydrine varie avec les auteurs.

TOENNIES utilise une solution de ninhydrine à 2% dans l'acétone anhydre (103); WOIWOD préfère une solution à 0,1% dans le chloroforme contenant 1% de collidine.

D'autres auteurs utilisent simplement une solution de ninhydrine à 0,2% dans le butanol avec ou sans addition d'acide acétique.

Pour nos expériences, nous avons utilisé la formule préconisée par BLASS (116):

Cependant, si on abandonne le chromatogramme à l'obscurité, seule persistera avec toute son intensité la tache bleue de la proline, tandis que celles des autres acides aminés pâlissent au bout de quelques heures.

B°. Permanganate de Potassium:

DALGLIESH (109) utilise une solution de permanganate de potassium à 1% contenant 2% de carbonate de sodium.

Ce procédé ne doit pas être utilisé lorsque le solvant employé est le phénol.

Il est très sensible pour la méthionine, assez sensible pour le tryptophane, la tyrosine, la proline, l'histidine; tous ces acides aminés donnent un spot jaune sur fond violet.

C°. Réactif d'EHRlich:

Le réactif d'Ehrlich (solution de paradiméthylamino-benzaldéhyde à 0,50%) permet de caractériser le tryptophane. En solution alcoolique chlorhydrique, il réagit avec cet acide aminé en donnant un spot bleu (110).

En solution sulfurique (84 et 113), il donne avec le tryptophane une tache violette après quelques heures, tandis que les autres acides aminés ne réagissent pas.

D°. Vanilline:

CURZON et GILTROW (111) préconisent l'emploi d'une solution de vanilline dans le N-propanol. Après chauffage à 110° C durant 10 minutes, on pulvérise une solution de potasse alcoolique à 1% et on chauffe de nouveau.

L'ornithine donne un spot saumon après 30 secondes, spot qui devient jaune brun par la suite.

La proline et l'hydroxyproline donnent des spots rouges après 6 heures.

E°. Méthode de REINDEL et HOPE à la benzidine (112):

Cette méthode consiste à traiter le chromatogramme par un mélange alcool éthylique-acétone (V/V) puis à le passer dans une atmosphère de chlore. Il est ensuite plongé dans une solution à 1 % de benzidine dans de l'acide acétique à 10 % et lavé par trois fois dans de l'alcool éthylique.

C'est un procédé excellent pour tous les acides aminés, sauf pour la cystéine et la cystine. La méthionine ne réagit que faiblement.

F°. Réactif de PAULY:

DENT (I9) utilise le réactif de PAULY pour révéler les spots de l'histidine et de la tyrosine.

Le réactif employé a la composition suivante:

- solution A: { acide sulfanilique 0,5 g.
 (acide chlorhydrique: 100 ml
- solution B: solution de nitrite de sodium à 5%
- solution C: solution de carbonate de sodium à 10%

Au moment de l'emploi, on mélange 10 ml de A, 5 ml de B, 10 ml de C. Cette solution est pulvérisée sur le chromatogramme. Les spots de l'histidine et de la tyrosine apparaissent respectivement colorés en rouge et en rouge-violet.

Les autres acides aminés ne réagissent pas.

G°. Réactif de SAKAGUCHI: Arginine et dérivés guanidiques (II3).

La composition du réactif de SAKAGUCHI est la suivante:

- solution A: solution de Δ naphtol à 0,01% dans de l'alcool à 95° contenant 5% d'urée.
- solution B: solution d'hypobromite de sodium à 5%
(2g. de brome dans 100ml de soude à 5%)

On ajoute extemporanément 5 pastilles de soude à 10 ml de solution A. Dès que la dissolution est effectuée, on pulvérise ce réactif sur le chromatogramme; on sèche puis on pulvérise la solution B.

Le spot de l'arginine est coloré en rouge tandis que les spots des autres dérivés guanidiques ont des colorations allant du rose violacé au rose fleur de pêcher.

H°. Réactif au nitroprussiate: cystine et cystéine (IO3):

La mise en évidence de la cystine et de la cystéine peut se faire, grâce au réactif suivant:

Solution A: { nitroprussiate de sodium 0,30 g
 { acide sulfurique 2N 1 ml
 { méthanol 20 ml
 { ammoniacque concentrée 2 ml

filtrer pour éliminer le précipité.

Solution B: { cyanure de sodium 0,40 g
 { eau 1 ml
 { méthanol 20 ml

Plonger le papier dans la solution A: le spot de la cystéine (groupement SH) se colore en rouge.

Pour révéler la cystine, il faut plonger le papier dans la solution B, après l'avoir plongé dans la solution A: il y a réduction du groupement S-S et la couleur rouge du spot apparaît en quelques secondes.

I°- Réactif de FEIGL: cystine, cystéine et méthionine (II4):

La révélation des acides aminés soufrés est possible par le réactif de FEIGL.

On ajoute extemporanément à une solution aqueuse 0,05N d'iode, 1,5% d'azoture de sodium. On trempe le papier dans ce réactif. Les spots des acides aminés soufrés donnent une tache blanche sur un fond brun clair. L'apparition de cette tache se fait en des temps variables:

- cystéine immédiat
- cystine après 15 minutes
- méthionine après une heure.

J°. Réactif de GERNGROSS: tyrosine (II3):

La présence de tyrosine est décelée par le réactif de GERNGROSS.

La composition de ce réactif est la suivante:

solution A: solution à 0,1% de α nitroso β naphtol dans l'alcool à 95°.

solution B: acide nitrique à 10%

On pulvérise d'abord la solution A sur le chromatogramme, puis on sèche dans un courant d'air chaud.

On effectue alors une deuxième pulvérisation avec la solution B et on chauffe durant 3 minutes à 90°C: le spot de la tyrosine apparaît en rouge sur un fond vert pâle.

Sur un chromatogramme sec ou sur le produit d'élution d'un spot, il est donc possible d'appliquer tout réactif spécifique d'un amino-acide, pourvu qu'il soit suffisamment sensible.

4) CONSERVATION DES CHROMATOGRAMMES TRAITES A LA NINHYDRINE:

Si l'on suit l'évolution des chromatogrammes traités à la ninhydrine, on voit la coloration de leurs spots diminuer en intensité pour disparaître complètement au bout d'un certain temps.

Pour fixer la place des spots dès la révélation, il faut délimiter leur contour au crayon. Et pour maintenir leur coloration, on peut employer la technique de KAWERAN (II5) . Cette technique consiste à pulvériser sur le spot, uniquement, une solution saturée de nitrate de cuivre dans un mélange d'alcool et d'acide nitrique. Le cuivre forme un complexe rose avec l'acide aminé et la couleur du spot est fixée et inaltérable.

Notons que toute lecture d'un chromatogramme doit cependant se faire avant l'application de la solution de cuivre, sur le chromatogramme tel qu'il est après sa révélation à la ninhydrine.

Dès leur révélation, les spots sont en effet bien délimités et se présentent avec leur intensité maxima. Même faite avec beaucoup de soins, la pulvérisation avec la solution de KAWERAN peut conduire à des erreurs. En effet, la solution cuivrique se répand toujours par capillarité sur une plus grande surface que celle du spot lui-même, entraînant une certaine partie de la coloration du spot. Si donc deux spots sont très voisins, leur lecture en devient difficile sinon impossible, par suite du chevauchement.

Il est donc recommandé de lire et d'interpréter les chromatogrammes dès leur révélation terminée.

Nous noterons ici le moyen de conservation indiqué par DARMON et FAUCQUEMBERGUE (I66) que nous indiquons dans le paragraphe suivant relatif au dosage des acides aminés: le microfilm obtenu avec chaque chromatogramme est de conservation indéfinie et permet une lecture des résultats à n'importe quel moment.

V°° - APPLICATION AU DOSAGE DES ACIDES AMINES .
=====

La chromatographie sur papier permet, non seulement l'évaluation qualitative des amino-acides, mais aussi leur évaluation quantitative, relativement facile et rapide.

Tous les anciens procédés de dosage (telles que les méthodes de dosage microbiologique -II7), restent applicables, puisque l'élution des spots chromatographiques permet d'obtenir des solutions pures d'acides aminés, sur lesquelles on peut appliquer toutes ces méthodes.

Nous énumérerons maintenant les principales techniques d'évaluation quantitative des acides aminés, à partir des spots obtenus par chromatographie.

1°. D'après la taille ou l'intensité des spots:

FISHER et ses collaborateurs (II9) établirent l'existence d'une relation linéaire entre la longueur du spot et le logarithme de la concentration en acide aminé. Cette dernière dépend également de la surface du spot.

En comparant la taille ou l'intensité du spot inconnu avec celle du spot obtenu dans les mêmes conditions pour une solution étalon d'acide aminé correspondant, on peut donc déterminer la teneur en acide aminé d'une solution.

Ce procédé rapide et pratique donne de bons résultats et fut également préconisé par POLSON (II8) et BRIMLEY (I20)

DARMON et FAUCQUEMBERGUE (I66) proposèrent une modification de cette technique qui consiste à microfilmer le chromatogramme. Le film reproduit ce dernier dans ses moindres détails et permet d'utiliser une densité de lumière incidente beaucoup plus faible que celle nécessitée par l'examen direct du chromatogramme. Il en résulte une meilleure méthode, car le seuil de la sensibilité est diminué tandis que sa limite supérieure est augmentée.

Enfin, cette méthode permet de consulter et de comparer les chromatogrammes à n'importe quel moment, puisque la conservation d'un microfilm est indéfinie.

2°. Dosage colorimétrique avec la ninhydrine:

La méthode primitive de NAFTALIN (I2I) consistait à éluer le spot chromatographique avec de l'acétone dans des conditions de pH bien déterminées. La solution acéto-

nique était alors traitée par de la ninhydrine et son coefficient d'extinction déterminé par photolorimétrie. POLONOVSKI (I22) fit l'étude cinétique de cette méthode et montra qu'elle donnait une erreur de 10% dans le cas d'acides aminés provenant d'hydrolysats.

De nombreuses modifications ont été proposées (I23, I24, I25, I67, I68, 246, 247), et il semblerait que la meilleure méthode soit celle de DOISSONAS (I26).

Cette méthode consiste tout d'abord à traiter chaque spot par une solution à 1% de potasse dans le méthanol et à chauffer 15 minutes à 60°C de façon à détruire les ions ammonium.

Chaque spot est alors découpé et placé dans un tube avec une solution de ninhydrine de pH = 4,7; les tubes sont maintenus 20 minutes au bain-marie bouillant, puis placés dans de l'eau froide. On leur ajoute 5 ml d'un mélange volume à volume de propanol et d'eau pour diluer, et on lit le coefficient d'extinction après 10 minutes de contact, à 570m μ . Pour chaque essai, il faut naturellement effectuer un témoin (papier seul) dont on déduira le coefficient d'extinction des résultats trouvés avec chaque spot à doser.

3°. Formation d'un complexe cuivrique :

Par action, sur l'éluat d'un spot chromatographique, d'une solution de phosphate cuivrique en excès, on forme avec les acides aminés, des complexes cuivriques solubles.

Le dosage peut alors s'effectuer de deux façons:

- A) évaluation colorimétrique,
grâce au diéthylcarbamate (I27, I28);
- B) polarimétrie des complexes cuivriques (I29)

4°. Dosage de l'azote total:

après microkjeldahlisation (KLATZIN, I30).

5°. Dosage après transformation en dérivé radioactif:

et estimation de la radioactivité selon la technique de KESTON (I31).

VI^{oo}- METHODES SPECIALES DE CHROMATOGRAPHIE DES AMINO-ACIDES.

- . Acides aminés soufrés
- . Précipitation par l'acide phosphotungstique
- . D N P amino-acides
- . Acide γ aminobutyrique
- . Méthode des témoins internes.

1) CHROMATOGRAPHIE DES ACIDES AMINES SOUFRES: méthionine, cystine et cystéine (I32):

Dans ce cas spécial, il faut déposer sur le spot prêt à être chromatographié, une goutte d'eau oxygénée à 30%. Lorsque la goutte est sèche, on monte le chromatogramme selon les techniques générales.

La méthionine est transformée en méthionine-sulfone et en méthionine-sulfoxyde, tandis que l'emploi d'eau oxygénée et de molybdate d'ammonium, transforme la méthionine en méthionine-sulfone uniquement.

La cystine et la cystéine se transforment en acide cystéique, ce qui permet la chromatographie certaine de ces substances: en effet, la cystéine se décompose en général complètement lors de la chromatographie, tandis que l'acide cystéique, lui, est stable. Cependant, il faut que l'oxydation soit complète, sinon on observerait la formation de "queues" assez importantes sur les chromatogrammes. (VAN HALTEREN, I33).

2) SEPARATION DES AMINO-ACIDES PAR L'ACIDE PHOSPHOTUNGSTIQUE:

BLASS et MACHEBOEUF (I37) proposent une méthode permettant la séparation des acides aminés en deux groupes:

- 1) acides aminés précipitables par l'acide phosphotungstique en milieu acide: bases hexoniques.
- 2) acides aminés non précipités dans ces conditions: amino-acides autres que les bases hexoniques .

3) CHROMATOGRAPHIE DES DERIVES 2-4 DINITROPHENYLES DES AMINO-ACIDES:

La fixation du radical dinitrophényle par action du dinitrofluorobenzène sur les groupements aminés libres, constitue une méthode précise d'identification des acides aminés.

La difficulté d'utilisation de cette méthode réside dans la séparation des amino-acides dinitrophénylés (DNP amino-acides).

F. SANGER (I57) utilisait la chromatographie de partage sur colonne de gel de silice, ce qui est une méthode fort délicate.

D'autres auteurs (I58) employaient un gel de silice tamponné, SYNGE (I59), l'ionophorèse sur gel de silice à pH=6, et PARTRIDGE et SWAIN (I60), la chromatographie sur colonne de caoutchouc chloré.

La chromatographie sur papier semble le procédé de choix pour la séparation et l'identification des DNP amino-acides préparés selon les méthodes de SANGER (I61) ou de PORTER (I62).

Les techniques de préparation de ces dérivés dinitrophénylés varient dans les détails selon l'acide aminé employé. Nous donnerons ici la préparation du dérivé DNP de la phénylalanine, à titre indicatif.

On fait agir sur 0,2g. de l-phénylalanine et 0,4 g. de bicarbonate de sodium dissous dans 5 ml d'eau, 10 ml d'une solution alcoolique de 2-4 dinitrofluorobenzène à 4%. Après avoir agité le mélange durant 2 heures à température ordinaire, on le concentre pour enlever l'alcool. Le résidu dissous dans de l'eau, est extrait à l'éther de façon à enlever l'excès de dinitrofluorobenzène n'ayant pas réagi. La solution aqueuse est ensuite acidifiée; il s'en sépare une sorte d'huile qui se solidifie immédiatement, sous une forme amorphe. La cristallisation ultérieure du produit peut s'effectuer à partir d'un mélange eau-alcool méthylique.

G. BISERTE et R. OSTEUX (I63) donnent une méthode pour la chromatographie en une ou deux dimensions des DNP amino-acides, en utilisant des systèmes de solvants qui ne produisent pas d'effets de traînées:

- 1) toluène 5p./ pyridine 1p./ monochlorhydrine du glycol 3 p./ ammoniacque 3 p.
- 2) phénol 1p./ alcool isoamylique 1p./ eau 1p.
- 3) pyridine 6 p./ alcool isoamylique 14 p./ ammoniacque 20p.

Une méthode plus simple a été proposée par ROVERY et FABRE (I64): ces auteurs utilisent comme phase mobile un simple tampon citrate-acide chlorhydrique de pH=6,2. L'ordre des spots est tout différent de celui obtenu avec les

solvants organiques.

Notons enfin que cette méthode permet, non seulement la séparation et l'identification des DNP amino-acides, mais aussi leur dosage (I65).

4) TEST DE DISTINCTION DES ACIDES α AMINES:

CRUMPLER et DENT (I7) proposent une méthode de distinction basée sur le fait que les acides α aminés, les corps de structure α aminocarboxylique, forment des complexes avec le cuivre. La plupart des acides aminés se complexent (alanine, arginine, asparagine, glycine, histidine, sérine, acides glutamique et aspartique...).

L'acide γ aminobutyrique et la taurine ne se complexent pas et résistent au traitement par le cuivre. En faisant monter en même temps deux chromatogrammes dont un seul a été traité préalablement par une pulvérisation de carbonate basique de cuivre, on peut donc, par comparaison, identifier avec certitude l'acide γ aminobutyrique.

5) METHODE DES TEMOINS INTERNES:

Il est des cas où l'identification d'un acide aminé est délicate et sa présence discutée.

LACHEBOEUF propose alors (I2) de chromatographier en double la substance et d'incorporer à un seul échantillon, une certaine quantité d'acide aminé témoin, acide aminé dont la présence est discutée. La simple comparaison des différents spots permet le plus souvent de trouver la solution du problème. Il doit y avoir en effet, renforcement du spot étudié, sans apparition concomitante d'un nouveau spot.

../...

Chromatographie sur papier

Acides Aminés

Papier Schleicher et Schull. 2043 A.



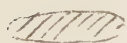
Acide amino
butyrique



Alanine



Acide Glutamique



Acide Aspartique



Arginine



Cystéine-Cystine



Arginine



Alanine



Glycine



Sérine



Acide glutamique



Acide aspartique

départ x x

-Butanol/Acide acétique
40 heures

x
- Phénol/ Ammoniaque
18 heures.

- CONCLUSION -
=====

L'identification d'un ou plusieurs acides aminés est donc possible, et ce, d'une façon certaine, par la chromatographie sur papier:

- 1) en effectuant plusieurs chromatogrammes en solvants différents.
- 2) en comparant avec des acides témoins, chromatographiés dans les mêmes conditions.
- 3) en utilisant des réactions chimiques caractéristiques de certains groupes d'acides aminés et suffisamment sensibles pour pouvoir être utilisées avec succès dans cette microméthode.

3) APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER A LA SEPARATION ET A L'IDENTIFICATION DES ACIDES ORGANIQUES.

Etant donnée la valeur des résultats obtenus avec la chromatographie lors de nos recherches sur les acides aminés, nous avons essayé de déterminer les composants organiques libres des milieux de culture de B. roseus fluorescens.

Dans ce but, nous avons recherché les acides organiques y existant, acides di- ou tricarboxyliques, acides cétoniques.

Nous avons rencontré dans nos débuts de très nombreux déboires: spots mal délimités, queues importantes, mauvaise évaporation des solvants utilisés qui empêchait toute révélation ultérieure. Après des essais aussi nombreux qu'infructueux, tant dans la chromatographie des acides di- ou tricarboxyliques que dans celle des acides cétoniques, nous avons pu enfin trouver une méthode dont les résultats furent assez satisfaisants.

Nous envisagerons donc successivement:

- A) Chromatographie des acides organiques hydrosolubles et non volatils ;
- B) Chromatographie des acides cétoniques sous forme de leur 2-4 dinitrophénylhydrazone.

A) Chromatographie des Acides Organiques hydrosolubles
et non volatils

1°. PREPARATION DE LA SOLUTION A CHROMATOGRAPHIER:

=====

Comme dans la chromatographie des acides aminés, il est absolument nécessaire d'éliminer de l'échantillon à examiner, toute substance interférente.

--LE DESSALAGE ELECTROLYTIQUE selon la technique de CONSDEN, GORDON et MARTIN (76), au moyen de l'appareil de DENT (223), est employé ici comme avec les acides aminés.

Mais si dans le cas des acides aminés, STEIN et MOORE avaient signalé des pertes en arginine (77), ZENISCK et KRAL montrèrent que certains acides organiques pouvaient être dégradés (224).

KATZ et CHAIKOFF, en opérant à un pH compris entre 2

ou 3, obtinrent de meilleurs résultats (225).

-- LES RESINES ECHANGEUSES D'IONS rendent également en ce domaine de très grands services (226, 227, 229).

NORDMANN et ses collaborateurs (230), discutant sur l'emploi de résines faiblement ou fortement basiques, conseillent plutôt l'emploi de ces dernières, bien que PHILIPS et POLLARD (229) ainsi que HULME (228) aient noté une transformation partielle du glucose en acide lactique sur ces résines.

-- Dans nos expériences, nous avons préféré EXTRAIRE LES ACIDES ORGANIQUES PAR L'ETHER.

MARTIUS et ses collaborateurs (231) furent les premiers à utiliser ce moyen pour extraire les acides organiques d'homogénat de foie: ils les traitaient par l'éther durant 3 jours.

NORDMANN et ses collaborateurs (230) reprirent cette méthode mais, n'opérant que durant 10 heures, ils ne réussissaient pas à extraire la totalité des acides. Ils abandonnèrent ces recherches, trouvant la perte de temps par trop importante.

Nous avons cependant utilisé cette méthode.

Lorsque l'éther reste suffisamment en contact, l'extraction des acides est totale et la solution à chromatographier donne de très beaux spots.

La culture de B. roseus fluorescens, effectuée en ballons, était centrifugée et amenée à un pH inférieur à 3 par addition d'acide sulfurique concentré.

Les acides organiques ainsi libérés, étaient alors extraits par de l'éther. Chaque ballon était placé dans une machine à agiter durant une heure, et l'éther décanté; on répétait cette opération 3 à 4 fois. Puis on laissait en contact chaque échantillon d'éthér avec le milieu de culture durant 6 à 8 heures. L'éther était chaque fois décanté et l'opération répétée durant 8 jours.

Les extraits éthérés étaient réunis, évaporés; le résidu, repris par de l'eau distillée, pouvait alors être chromatographié.

2°. SOLVANTS EMPLOYES:

LUGG et OVERELL (219) furent les premiers à remarquer la formation de traînées et l'élongation des spots, lorsqu'ils employaient comme solvant du butanol saturé d'eau. Or, s'ils introduisaient dans le solvant de l'acide formique ou de l'acide acétique, ils constataient la diminution et même la disparition des traînées.

Il est en effet très important d'influer sur l'ionisation des substances étudiées: la diminution de cette ionisation, par addition en quantité suffisante d'acides (ou même de bases, comme le montrèrent les travaux de MUNIER et MACHEBOEUF sur les alcaloïdes -220-), supprime tous les artefacts de la chromatographie.

Mais il existe un inconvénient qui est loin d'être négligeable: toute trace d'acide employé dans le solvant doit être totalement éliminée avant la révélation par des indicateurs de pH, sinon le chromatogramme est irrémédiablement perdu.

JERMSTAD et JENSEN (221) essayèrent alors comme solvant un mélange d'acétate d'éthyle, d'acide formique et d'eau, et obtinrent des résultats plus satisfaisants.

Mais les meilleurs solvants furent préconisés par CHEFTEL, MUNIER et MACHEBOEUF (222). Pour éliminer rapidement et TOTALEMENT tout l'acide volatil, ces auteurs proposèrent d'incorporer au solvant des substances volatiles dont les vapeurs sont capables d'entraîner tout l'acide employé. Un simple séchage à l'air suffit alors, et la révélation devient possible peu de temps après la fin de la chromatographie. Ils emploient dans ce but le benzoate de méthyle ou l'eucalyptol et nous avons retenu pour nos expériences le mélange suivant:

(propanol 50 ml
(eucalyptol 50 ml
(acide formique 20 ml

Ajouter de l'eau goutte à goutte en agitant jusqu'à trouble persistant et laisser décanter. Éliminer la phase aqueuse infime et utiliser comme solvant la phase restante.

Il est préférable d'utiliser ce solvant 48 heures après sa préparation: il existe en effet au sein du solvant des phénomènes d'estérification influant sur sa constitution.

Après 2 à 3 jours, l'état d'équilibre est atteint et la chromatographie peut se dérouler avec le maximum d'efficacité (219, 221, 222, 232).

3°. REALISATION DU CHROMATOGRAMME:

=====

Chaque échantillon est alors déposé sur une ligne de départ située à 2,5 cm de l'extrémité de la feuille de papier, en gouttes distantes de 3 à 4 cm. On prend soin de ne pas placer les premières gouttes trop près des bords, afin d'éviter "les effets de bord".

Le chromatogramme est alors enroulé et fixé comme nous l'avons indiqué dans les techniques générales, et mis à révéler par chromatographie ascendante.

L'opération dure environ 8 à 9 heures avec, comme solvant, le mélange propanol/eucalyptol/acide formique (50/50/20) cité plus haut, et comme papier, le papier Schleicher et Schull n° 2.043 A.

Après ce temps, le chromatogramme est retiré, et mis à sécher un minimum de trois heures dans une pièce ventilée.

Il est alors prêt à être révélé.

Nous avons utilisé un papier Schleicher et Schull sans traitement préalable. Signalons que SMITH et SPIESTERBACH (234) emploient un papier traité par une solution aqueuse à 1% d'alginate d'ammonium, puis par l'acide chlorhydrique et l'alcool, pour la chromatographie des acides uroniques, citrique, malique, tartrique et succinique.

4°. REVELATION:

=====

L'emploi d'eucalyptol permet d'éliminer toute trace d'acide formique du papier. et de ce fait, d'utiliser des indicateurs de pH comme révélateurs. Si cependant, il restait encore un peu d'acide, le chromatogramme ne serait pas perdu: il suffirait en effet de le laisser 24 heures dans la pièce ventilée pour que les spots apparaissent nettement par la suite.

Pour leur révélation, nous avons pulvérisé sur les chromatogrammes le mélange suivant (219):

bleu de bromophénol 50 mg
éthanol 100 ml
soude N/10...qs pour coloration pourpre

Le chromatogramme est alors séché à la température ordinaire.

Un mélange d'hélianthine dans de l'alcool, nous a donné également d'excellents résultats.

D'autres indicateurs de pH peuvent être employés: le vert de bromocrésol en solution alcoolique, ou le rouge de méthyle (solution alcoolique à 0,1 %, mélangée à un tampon phosphate M/15 de pH = 7 -233).

On peut aussi utiliser pour la révélation, un mélange iodure-iodate de potassium et amidon (235) ou mettre à profit des réactions différentielles. NORDMANN et ses collaborateurs (230), ainsi que SMITH (234), donnent une liste très complète de ces méthodes spéciales, s'adressant à des types divers de produits organiques: acides cétoniques, phénoliques ou uroniques, dérivés phosphoriques, imidazoliques ou dérivés aminés aromatiques, purines, et acide hippurique.

-- Les identifications furent faites en utilisant une solution de bleu de bromophénol ou d'hélianthine, et en faisant monter en même temps des témoins d'acides organiques.

B) Chromatographie des acides cétoniques sous forme de leur 2-4 dinitrophenylhydrazone.

Au point de vue biologique, les acides cétoniques ne constituent pas un groupe homogène, et chacun possède différents caractères et différentes fonctions. Leur détermination en bloc, n'a donc qu'un intérêt limité et c'est pourquoi les biochimistes recherchent toujours de nouvelles méthodes pour leur séparation.

On a tout de suite pensé que la chromatographie sur papier pourrait être un excellent moyen pour séparer les divers acides cétoniques. Dans nos expériences, nous avons tout d'abord essayé de les séparer sous forme libre. Nous avons donc effectué une chromatographie ascendante selon les techniques normales et nous révélions les chromatogrammes par l'orthopétylènediamine (236) ou par le chlorhydrate de semicarbazide (237).

Malheureusement, ces méthodes n'étaient pas suffisamment sensibles pour nos expériences, et il nous a fallu transformer les acides cétoniques en leur 2-4 dinitrophénylhydrazone. (2-4 DNF céto-acides). La chromatographie sur

papier de ces dérivés nous a permis d'obtenir quelques résultats.

DAKIN et DUDLEY (238) signalent les premiers une méthode de séparation d'acides cétoniques, en utilisant leur 4-nitrophénylhydrazone. Leur méthode fut complétée par BARRENSCHEEN et DREGUSS (239), puis par CASE (240) et actuellement de très nombreuses modifications y sont apportées.

L'étude des acides cétoniques du sang et de l'urine humaine et de leurs variations au cours d'états pathologiques ou non, a permis de mettre au point des méthodes d'extraction des acides cétoniques et de préparation de leur 2-4 dinitrophénylhydrazone, très sensibles et très fidèles (241, 37, 206, 208).

Pour séparer les acides cétoniques fermés au cours du métabolisme bactérien, nous partions de cultures de *B. roseus fluorescens* sur divers milieux, centrifugées pour éliminer les corps bactériens. A partir de ces cultures, nous préparions et extrayons les 2-4 dinitrophénylhydrazones des acides cétoniques présents. Nous avons utilisé la nouvelle technique de CAVALLINI et FRONTALI (207), dont les différentes étapes sont les suivantes:

I° DEPROTEINISATION PAR L'ACIDE TUNGSTIQUE:

On mélange à la culture microbienne, dans la proportion de 1/5, la solution suivante préparée extemporanément:

eau	60 ml
tungstate de sodium à 10%	20 ml
acide sulfurique. 2/3 N	20 ml

Après un contact de 10 minutes, filtrer.

2° REACTION AVEC LA 2-4 DINITROPHENYLHYDRAZINE:

On mélange alors:

20 ml de filtrat
1 ml de solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine à 0,2% dans l'acide chlorhydrique 2N

On laisse en contact 25 minutes à la température du laboratoire.

3° EXTRACTION DES HYDRAZONES A L'ETHER: =====

Après ce contact de 25 minutes, les hydrazones sont extraites au moyen de 5 ml d'éther éthylique, jusqu'à ce que celui-ci ne soit plus jaune.

L'extraction doit se faire avec le maximum de précautions, afin d'éviter les pertes dues à l'extrême volatilité de ce solvant.

Les produits étherés sont réunis et soumis à l'évaporation. Le résidu est dissous dans 2 ml d'ammoniaque en solution normale et on ajoute 2 ml de chloroforme.

Le chloroforme va dissoudre la phénylhydrazine n'ayant pas réagi ainsi que les phénylhydrazones neutres. La couche supérieure ammoniacale, bien séparée par centrifugation, contient les phénylhydrazones des acides cétoniques et elle est prête à subir la chromatographie ou l'électrophorèse.

4° PREPARATION DE PHENYLHYDRAZONES TEMOINS: =====

Comme pour les acides aminés, nous effectuons la chromatographie et l'électrophorèse, parallèlement à des échantillons témoins.

Pour les acides cétoniques, nous faisons des solutions aqueuses à 1% (acide pyruvique, oxalacétique et α céto-glutarique) que nous traitons de la même manière que les filtrats de culture microbienne. Ainsi, si nous voulons ultérieurement avoir un moyen de dosage des acides cétoniques, nous avons pour les témoins et pour les produits microbiens, le même pourcentage de perte inévitable lors de l'extraction.

5° PREPARATION DU CHROMATOGRAMME: =====

Les DNP hydrazones en solution ammoniacale, sont déposées sous forme de gouttes, le long de la ligne de départ et espacées de 3 cm, selon les techniques générales de chromatographie. Après séchage des gouttes, le papier est enroulé en cylindre.

6° CHROMATOGRAPHIE ET REVELATION: =====

Afin de chromatographier les acides cétoniques extraits

nous avons tout d'abord utilisé le solvant préconisé par CAVALLINI et FRONTALI (207).

butanol	40 ml
éthanol	10 ml
eau	50 ml

Malheureusement, avec le papier Schleicher et Schull n° 2043 A, pyruvate et α cétooglutarate donnent des spots trop voisins pour permettre leur séparation et leur identification, surtout s'ils existent en mélange.

C'est avec le solvant suivant, que nous avons obtenu les meilleurs résultats (208):

n butanol	70 ml
éthanol	10 ml
NH ₄ OH 0,5N	20 ml

Le développement dure de 14 à 16 heures.

La lecture se fait simplement, sans révélation ultérieure, les spots de chaque acide se révèlent grâce à leur couleur jaune. Si la couleur est par trop faible, confirmation de l'existence du spot peut être obtenue par passage du chromatogramme à l'ultra-violet: les spots apparaissent nettement, comme des taches sombres sur un fond clair.

Le schéma nous donne la position relative des différents spots des 2-4 DNP des céto-acides (page 68).

2-4 DNP céto-acides :

16 h. dans le solvant : { n butanol 70
 { éthanol 10
 (NH₄OH 0,5N 20

Papier Schleicher et Schüll n° 2043.A.



départ	x	x	x
	Ac. α céto-glutémique	Ac. oxalo-	Ac. pyruvique
	2-4 DNP	acétique	2-4 DNP
		2-4 DNP	

- Nous voyons qu'à l'acide pyruvique, correspond deux spots :

1) un spot important, dont le Rf est de 0,44/0,47
(dans nos conditions d'expérience)

2) un spot moins important de Rf 0,65/0,70

SELIGSON et SHAPIRO (242), ainsi que CAVALLINI et FRONTALI (207) retrouvent également ces deux taches. Ces auteurs pensent qu'il existe une isomérisation de la molécule de phénylhydrazone elle-même (isomérisation cis-trans du fait de la double liaison), ce qui expliquerait la présence des deux taches, correspondant à ces isomères. Lorsqu'il s'agit d'effectuer ensuite l'analyse quantitative, on ne tient pas compte de ces deux spots, mais on opère sur leur mélange.

- Avec l'acide oxaloacétique, nous pouvons obtenir trois spots :

1) le spot de sa propre phénylhydrazone

2) les deux spots des phénylhydrazones du pyruvate.

L'acide oxaloacétique est éminemment instable et il se décompose immédiatement en donnant de l'acide pyruvique.

Il ne se décèle que très rarement dans les milieux de culture, du fait même de son instabilité.

Lorsque nous avons préparé sa phénylhydrazone témoin, nous avons opéré rapidement sur une solution faite extemporanément, de sorte que seules des traces négligeables de pyruvate se sont formées.

Cette méthode chromatographique, combinée à une électrophorèse selon TRAUBER (243), permet de séparer et d'identifier facilement les acides cétoniques courants des métabolismes.

Elle permet également leur dosage:

- 1) par simple comparaison de l'intensité et de la grandeur des spots, avec les spots correspondant à une solution titrée de 2-4 DNP céto-acide, chromatographiée dans les mêmes conditions.
- 2) par dosage colorimétrique après élution des spots au moyen d'une solution normale de soude.
- 3) par dosage polarographique après élution des spots (244).

CHAPITRE III

=====

ELECTROPHORESE

La comparaison des résultats obtenus en montant différents chromatogrammes dans des solvants très divers (butanol acétique, phénol saturé d'eau ou phénol ammoniacal, butanol formique), nous a permis d'affirmer la présence d'acides aminés dans des cultures de *B. roseus fluorescens*. Dans le but de confirmer nos résultats, nous avons pensé que l'électrophorèse pourrait nous assurer, par une autre voie, de l'existence de divers métabolites.

L'électrophorèse est, en effet, non seulement applicable aux protéines et aux acides aminés, mais aussi aux acides cétoniques.

Utilisée dans l'étude des acides aminés, elle permet leur séparation en groupes différents de ceux obtenus en chromatographie. C'est ainsi qu'un spot très mobile en phénol peut correspondre à divers amino-acides de R_f élevé (lysine, arginine, tryptophane). L'électrophorèse permettra de déterminer la nature exacte de l'acide aminé: lysine et arginine migrent vers le pôle négatif et à des distances différentes, tandis que le tryptophane a une mobilité électrophorétique nulle (tampon véronal de pH 8,6).

Enfin, en utilisant des tampons de pH divers selon les techniques de DURRUM (156, 303), on peut obtenir la séparation de très nombreux acides aminés: en effet, les amino-acides se déplacent dans le champ électrique avec des vitesses de migration différentes suivant leur charge, charge variant avec le pH du milieu. Toute modification du pH entraînera donc des déplacements électrophorétiques différents.

Quant aux phénylhydrazones des acides cétoniques, leur mobilité électrophorétique distincte permet de comparer et de confirmer les résultats obtenus chromatographiquement.

L'électrophorèse était donc une méthode utile pour nos recherches sur le métabolisme de *B. roseus fluorescens*, d'autant qu'elle est très sensible et fidèle; nous l'avons donc utilisée chaque fois que nous l'avons pu.

Une particule protéinique placée en suspension dans un champ électrique, se dirige vers l'une des électrodes. En milieu alcalin, les protéines possèdent une charge négative, tandis qu'en milieu acide, leur charge est positive.

Pour une certaine valeur de la réaction du milieu, leur mouvement devient nul: c'est cette valeur particulière du pH qui définit le point isoélectrique.

Cette propriété que nous venons brièvement de citer, est à la base de la remarquable technique de séparation et d'étude des protéines, donnée par TISELIUS en 1937.

L'électrophorèse est devenue une méthode très précieuse dans tous les travaux sur les protéines. Mais l'emploi de l'appareil de TISELIUS présente de nombreuses difficultés: prix élevé, faibles rendements, manipulations délicates et longues.

L'électrophorèse dans le papier, au contraire, est une technique beaucoup plus simple qui permet d'éviter ces inconvénients, tout en fournissant des résultats suffisamment précis pour la plupart des cas. Cette méthode dérive des travaux de TISELIUS lui-même et de ses collaborateurs (301, 302): l'électrophorèse durait 12 heures au sein d'un papier immergé dans un solvant organique.

La technique de DURRUM (303) est semblable, mais ici le papier plonge dans un tampon véronal de pH=8,6.

A la fin de la même époque, TURBA et ENENKEL (304) ont publié également une méthode dérivée de celle de TISELIUS.

C'est en 1951 que M. MACHEBOEUF proposa une excellente technique d'électrophorèse sur papier (205). Cette méthode consiste à déposer sur un papier de texture convenablement choisie, des gouttes de la solution à analyser. Ce papier est placé dans un appareil à électrophorèse type MACHEBOEUF, REBEYROTTE et BRUNERIE. Après l'avoir imprégné d'un tampon convenablement choisi, il est soumis à l'action d'un courant électrique continu, sous haute tension, durant 5 heures environ.

Le liquide du papier se déplace en fonction de la somme algébrique de deux écoulements:

- 1) évaporation pendant l'électrophorèse
- 2) électroendosmose ou écoulement qui transporte du liquide de l'électrode (+) vers l'électrode (-).

Grâce au déplacement du liquide dont la vitesse varie en fonction de l'éloignement, chaque type de protéine va être transporté en un point différent et caractéristique. Chaque spot s'arrête lorsque nous avons:

flux du liquide = (-) déplacement électrophorétique de la protéine considérée.

La position définitive d'une protéine est indépendante de sa position initiale et de la durée de l'expérience, à condition que cette durée ait été suffisante pour que l'équilibre soit atteint.

Pour l'étude des acides aminés synthétisés par *B. roseus fluorescens*, nous avons utilisé l'appareil d'électrophorèse de MACHEBOEUF, REBEYROTTE et BRUNERIE, et nous avons opéré avec une solution tampon de véronal à pH=8,6 :

(véronal sodique (5-5 diethyl	
{ barbiturate de sodium)	19,62 g
{ acétate de sodium	12,95 g
{ acide chlorhydrique N/10	120 ml
{ eau bidistillée QS	2.000 ml

Nous utilisons pour l'électrophorèse, des solutions d'acides aminés ayant subi les mêmes purifications (des-salage, délipidation..., etc...) que celles employées lors de la chromatographie sur papier.

Lorsque l'électrophorèse était terminée, le papier était retiré de l'appareil, séché à l'étuve et les spots des amino-acides révélés par pulvérisation d'une solution de ninhydrine semblable à celle utilisée lors de la chromatographie sur papier (II6)

--ninhydrine à 0,1 % dans du butanol contenant 2% d'acide acétique et 0,1 % de collidine.--

La disposition particulière des acides aminés permet leur identification et nous possédons ainsi une confirmation des résultats précédemment obtenus par chromatographie sur papier.

Voici un schéma de la disposition des principaux acides aminés après une électrophorèse en tampon véronal (pH=8,6) et sous haute tension durant 5 heures:

Départ

méthionine

lysine

Sérine

Acide aspartique

Arginine

Glycine

Acide glutamique

Alanine

+

-

Hte tension

tampon véronal pH 8,6

5 h.30

Acides Aminés

L'électrophorèse des 2-4 dinitrophénylhydrazones des acides cétoniques est également possible. En effet, ces composés possèdent une charge négative, due au groupement carboxyle, et plus particulièrement nette à pH alcalin.

On part de la solution ammoniacale obtenue à partir des cultures microbiennes ou de solutions témoins, après extraction et purification selon la technique déjà décrite. (Chromatographie des acides cétoniques, selon CAVALLINI et FRONTALI, 207).

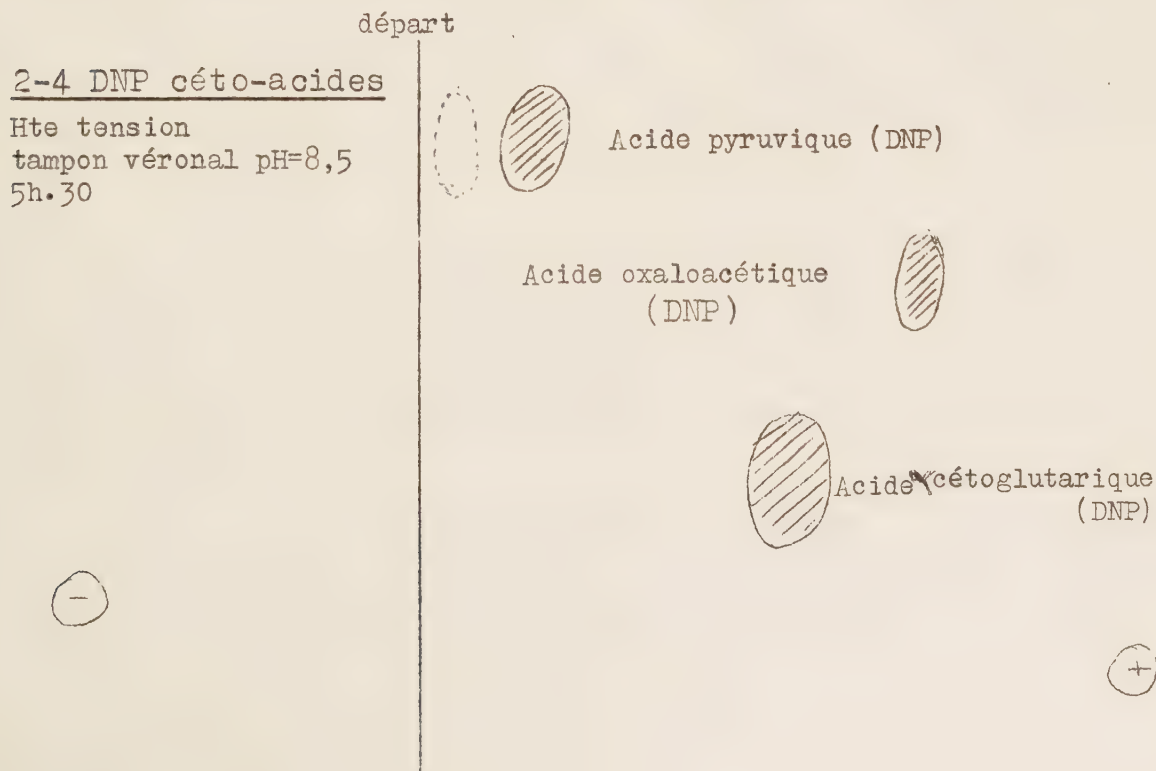
On opère sous haute tension durant 5h.30, avec le tampon véronal suivant: (243).

pH=8,5 { véronal sodique 55,80 g.
acétate de sodium 38,80 g.
HCl N 48 cm³
Eau distillée qsp 6.000 cm³

La lecture se fait par simple relevé des spots jaunes des 2-4 DNP céto-acides, dont nous donnons par ailleurs le schéma de leur répartition (dans nos conditions opératoires).

Nous voyons que là encore, le pyruvate donne deux spots dont les mobilités électrophorétiques sont un peu différentes.

Ces deux spots seraient dus, comme ceux obtenus lors de la chromatographie, à l'isomérisation cis-trans de la molécule de phénylhydrazone elle-même (207, 242, 244, 245).



EXTENSION DE LA METHODE ELECTROPHORETIQUE:

De même que la chromatographie sur papier peut s'effectuer en une ou en deux dimensions, il est possible de réaliser une électrophorèse bidimensionnelle, en utilisant deux tampons différents suivant deux directions perpendiculaires.

Mais il est également possible de combiner chromatographie et électrophorèse, en les pratiquant successivement dans deux directions perpendiculaires.

Dès 1939, STRAIN (312) avait combiné l'ionophorèse et la chromatographie sur colonne et COOLIDGE (313) séparait des protéines en appliquant à une colonne chromatographique un certain potentiel. Mais on peut considérer HAUGAARD et KRONER (314) comme les précurseurs de cette méthode combinant la chromatographie à l'électrophorèse sur papier: ces auteurs réalisaient simultanément les deux opérations en utilisant un papier traité préalablement par un tampon phosphaté de pH 6,2 et du phénol.

En 1951, DURRUM (156) associe la chromatographie et l'électrophorèse en utilisant une méthode de transfert, dite "strip transfer method": les amino-acides sont séparés par chromatographie sur une étroite bande de papier que l'on place ensuite sur une feuille de papier à électrophorèse, perpendiculairement au champ électrique.

La méthode fut perfectionnée et décrite sous le nom de "chromatoionophorèse" par BLASS, LECOMTE et POLONOVSKI (315). La chromatographie est tout d'abord réalisée au moyen d'un solvant volatil, et selon la méthode ascendante. Puis on effectue l'électrophorèse sur le même papier, dans un tampon de pH convenable, et selon une direction perpendiculaire.

L'association de ces deux méthodes permet l'analyse d'hydrolysats bactériens et l'identification des acides aminés libres du sérum sanguin normal et pathologique. Elle présente l'avantage de différencier aisément certaines bases aminées et certains amino-acides que la chromatographie en une ou deux dimensions ne pourrait dissocier que très difficilement.

Dans les essais que nous relatons, nous n'avons utilisé qu'une seule fois cette méthode: la chromatographie en solvants différents, puis l'électrophorèse nous permettaient une précision suffisante pour déterminer les divers acides aminés et cétoniques élaborés par *B. roseus fluorescens*.

- P A R T I E E X P E R I M E N T A L E -

=====

L'étude du métabolisme des Bactéries et de leurs exigences chimiques, a mis en évidence le fait que les besoins des microorganismes sont fonction de leur stade d'évolution. La cellule vivante, et plus particulièrement la Bactérie, est excessivement sensible aux troubles les plus légers de ses fonctions organiques ou aux modifications du milieu dans lequel elle croît. La vie de cette cellule nous apparaît comme conditionnée par une longue suite de réactions chimiques commandant la synthèse de substances qui lui sont nécessaires et leur catabolisme ultérieur.

La CATALYSE tient un rôle de tout premier plan dans ces mécanismes: on n'ignore plus actuellement l'influence prépondérante jouée dans les métabolismes par les vitamines, agissant comme facteurs propres de croissance (métabolites essentiels), ou comme coenzymes.

Enzymes, coenzymes, vitamines, hormones et même antibiotiques, agissent sur une ou plusieurs de ces réactions en chaîne qui permettent l'édification cellulaire. Suivant que leur action se montre favorisante ou non, on peut obtenir, soit une activation spectaculaire de certains processus mis en jeu, soit au contraire, l'arrêt de ces réactions. Il s'ensuit alors un véritable stockage du produit intermédiaire et le métabolisme normal ne peut plus se poursuivre dans ces conditions.

C'est à la détermination de ces stades successifs du métabolisme que les recherches actuelles s'appliquent. Malgré les progrès incessants de la Chimie Biologique, on ne pénètre que d'une façon lente les transformations qui se produisent à l'échelle cellulaire, et les résultats déjà trouvés, sont la source de nombreuses controverses, surtout dans le domaine bactérien (181, 182, 183).

Ce travail a pour but d'étudier certains points du métabolisme de B. roseus fluorescens J.G.MARCHAL 1937, dont nous rappellerons tout d'abord les caractères.

CARACTERES de B.ROSEUS FLUORESCENS

B.roseus fluorescens a été isolé en 1937 d'une eau, par J.G. MARCHAL (268). C'est un bacille mobile, dont la longueur oscille entre 0,9 et 1,9 microns et dont la largeur est de 0,6 microns. Il peut se présenter également sous une forme allongée de 1 à 4 microns de long sur 0,6 microns de large. Il conserve sa vitalité pendant un

temps assez long, et ne produit pas de spores.

Il est Gram négatif et se colore par les colorants usuels.

Ce germe est aérobic; il se développe très bien entre 18 et 28°C, et sa température optima de développement se situe aux environs de 25°C.

Il ne produit pas d'indole, fermente la plupart des sucres avec production d'acides, réduit les nitrates jusqu'au stade azote, et ne liquéfie pas la gélatine.

Il pousse parfaitement sur les milieux usuels, mais en milieux synthétiques de LASSEUR L₁ et L₂, *B.roseus fluorescens* développe une fluorescence et un pigment rouge caractéristique.

Nous avons utilisé pour cultiver cette espèce bactérienne les milieux synthétiques suivants:

A) Milieu L ₁ :	asparagine	0,90 g
	glycérine	2,50 g
	phosphate dipotassique	0,25 g
	sulfate de magnésium	0,50 g
	chlorure de calcium	0,04 g
	sulfate ferreux	0,01 g
	eau bidistillée	100 ml.

B) Milieu L ₂ :	asparagine	0,90 g
	glycérine	2 g
	glucose	1 g
	succinate d'ammonium	0,10 g
	phosphate dipotassique	0,25 g
	sulfate de magnésium	0,50 g
	chlorure de calcium	0,04 g
	sulfate ferreux	0,01 g
	eau bidistillée	100 ml.

En milieu L₁, *B.roseus fluorescens* produit dès le deuxième jour, un pigment fluorescent vert dans la zone supérieure du tube de culture. Après 4 à 5 jours, se forme son pigment rouge caractéristique qui se manifeste d'abord en profondeur, puis gagne progressivement la surface.

En milieu L₂, le pigment de *B. roseus fluorescens* apparaît dès le troisième jour.

Le pigment rouge produit en milieu synthétique et sous certaines conditions est une caractéristique de ce germe.

La CHROMOGENESE BACTERIENNE a fait depuis de nombreuses années l'objet de recherches dans notre Laboratoire.

L'élaboration des pigments bactériens exige non seulement la présence d'aliments hydrocarbonés et azotés dans les milieux de culture, mais aussi celle d'éléments inorganiques variés.

Le rôle des oligo-éléments dans la génèse des pigments bactériens, en particulier le rôle du magnésium et celui du fer, fut mis en évidence par Ph. LASSEUR et ses collaborateurs (213, 214, 215).

J.G. MARCHAL a montré que *B.roseus fluorescens* cultivé sur un milieu L₁ sans fer, ne produit qu'un pigment vert fluorescent; la formation du pigment rouge nécessite du fer. Il en est de même pour *B.caryocyaneus*, comme l'a observé A. DUPAIX (351). LASSEUR (335) montra également que l'addition de manganèse aux cultures de *B. mesentericus niger*, faisait apparaître un pigment bleu, qui permettait de différencier ses cultures de celles de *B.lactis niger* Gorini.

Dès 1911, Ph. LASSEUR avait montré le rôle variable des glucides sur la fluorescence des cultures de *B. chlorographis*, rôle variant selon leur nature et celle de l'aliment azoté qui leur est associé. En 1942, avec ses collaborateurs (336, 337), LASSEUR définit le rôle de l'aliment hydrocarboné sur la chromogénèse de quelques bactéries.

Cet auteur démontra également que l'influence du pH sur la chromogénèse n'était pas à négliger (338, 339, 340).

J.G. MARCHAL et ses collaborateurs reprirent plus tard l'étude du rôle des oligo-éléments (184, 218) et s'appliquèrent à rechercher les substances organiques indispensables. En particulier, ils se sont efforcés de définir le rôle des acides aminés dans la chromogénèse.

Ils établirent (185) l'influence sur la chromogénèse du nombre de radicaux glycolle entrant dans la constitution d'une molécule, et constatèrent que l'introduction de radicaux nouveaux dans une courte chaîne n'augmente pas nécessairement la valeur nutritive du produit et la fonction chromogène de la bactérie.

Le magnifique pigment rouge fourni par *B.roseus fluorescens* a pu être extrait par J.G.MARCHAL (341) qui, avec ses collaborateurs, en a déterminé certaines propriétés: sa structure pyrrolique tout d'abord (342), puis son influence sur la respiration de germes homologues ou hétérologues (343).

C'est en utilisant la méthode polarographique qu'ils prouvèrent également la présence de fer dans ce pigment (218, 345): ainsi serait expliqué le fait que *B. roseus fluorescens* exige la présence de fer dans le milieu pour manifester sa chromogénèse.

La signification du pigment dans la vie des bactéries chromogènes a toujours été discutée. Dès 1931, FRIEDHEIM (344) montrait que de la pyocyanine, ajoutée à des bactéries privées de toutes substances nutritives exogènes, catalysait la respiration. L'hémoglobine, la chlorophylle, les cytochromes sont des substances de structure porphyrinique et elles jouent le rôle de catalyseurs respiratoires.

Dans l'état actuel des recherches entreprises sur le pigment de *B. roseus fluorescens*, la présence de fer dans la molécule, sa structure pyrrolique, son action sur la respiration bactérienne, tendraient à le rapprocher des pigments respiratoires actuellement connus. De plus, tout semble indiquer que le pigment jouerait le rôle de vecteur de fer et que la bactérie pourrait en détacher facilement cet élément, pour l'utiliser dans la synthèse de certains enzymes qui lui sont indispensables pour assurer son métabolisme.

Nos essais portant sur certains points du métabolisme de *B. roseus fluorescens*, il s'agissait pour nous de connaître quels acides aminés ou acides organiques pouvaient être élaborés à partir de sources différentes d'azote et de carbone, ainsi que l'influence de ces mêmes substances sur la croissance, la respiration et certains processus métaboliques de ce germe (désamination, transamination).

- CHAPITRE I -
=====

UTILISATION DES ACIDES AMINES PAR

B. ROSEUS FLUORESCENS

Nous allons envisager successivement les points suivants:

- 1) Influence de certains acides aminés sur la croissance de B. roseus fluorescens
- 2) Etude de la désamination
- 3) Etude de la transamination.

1°- INFLUENCE DE CERTAINS ACIDES AMINES SUR LA CROISSANCE
DE B. ROSEUS FLUORESCENS
=====

B. roseus fluorescens comme tout être vivant, s'accroît, se reproduit et meurt. Il réalise des synthèses qui lui permettent de se multiplier avec une étonnante rapidité. Mais pour que sa croissance soit maxima, il faut qu'il trouve une ou plusieurs substances qui lui sont absolument nécessaires.

Si l'on considère un milieu où les sources de carbone et d'azote sont fournies par un seul acide aminé, la croissance bactérienne ne sera pas identique pour chaque amino-acide: toute substance n'est pas également assimilable par un microorganisme donné, même dans des conditions aussi semblables que possible. C'est pourquoi nous avons tout d'abord recherché l'influence de divers acides aminés sur la croissance de B. roseus fluorescens, en milieu tampon phosphate de pH=6,9 (la valeur de ce pH étant très favorable au développement de ce germe).

La croissance de cette bactérie sera fonction de l'assimilation de l'acide aminé incorporé, qui fournit à la fois le carbone et l'azote nécessaires à son développement et au maintien de sa vie.

Nous avons étudié sa croissance au moyen du biophotomètre enregistreur de BONET-MAURY.

PROTOCOLE:

Pour cette étude, nous utilisons:

a) des solutions aqueuses stériles d'acides aminés M/50 et amenées à pH=6,9.

b) une solution tampon phosphate de pH=6,9, que nous préparons en mélangeant 180 ml d'une solution de phosphate disodique à 11,87 g.‰ à 120 ml d'une solution de phosphate monopotassique à 9,10 g. ‰

Ce tampon ainsi préparé est stérilisé à 120°C durant 30 minutes.

Les germes utilisés proviennent d'une culture de *B. roseus fluorescens* sur gélose peptone. Après 17 heures de culture à 25°C, les germes sont mis en suspension et lavés plusieurs fois dans de l'eau physiologique. Après le dernier lavage, le culot de centrifugation est dispersé d'une façon homogène dans la solution tampon de pH=6,9.

Cette suspension microbienne sert à ensemençer la quantité de solution tampon qui nous sera nécessaire pour l'étude de la croissance au moyen du biophotomètre. Nous réalisons un ensemençement léger, de façon à obtenir une solution encore limpide: toute opacité, même faible, du milieu de départ, troublerait l'enregistrement ultérieur des variations de la densité optique de la culture.

Après une vigoureuse agitation, le tampon ensemençé est alors réparti dans chaque fiole du biophotomètre à raison de 7 ml. On ajoute ensuite chaque acide aminé à raison de 2 ml de solution M/50. Chaque fiole contient un seul acide aminé et nous avons répété nos expériences autant de fois qu'il a été nécessaire pour tester la croissance de *B. roseus fluorescens* en présence des acides aminés suivants:

glycine	I-arginine
l-alanine	d-arginine
d-alanine	acide l-aspartique
dl-alanine	acide dl-aspartique
β-alanine	acide l-glutamique
l-valine	acide d-glutamique
l-leucine	l-phénylalanine
dl-sérine	l-tryptophane
l-méthionine	l-histidine

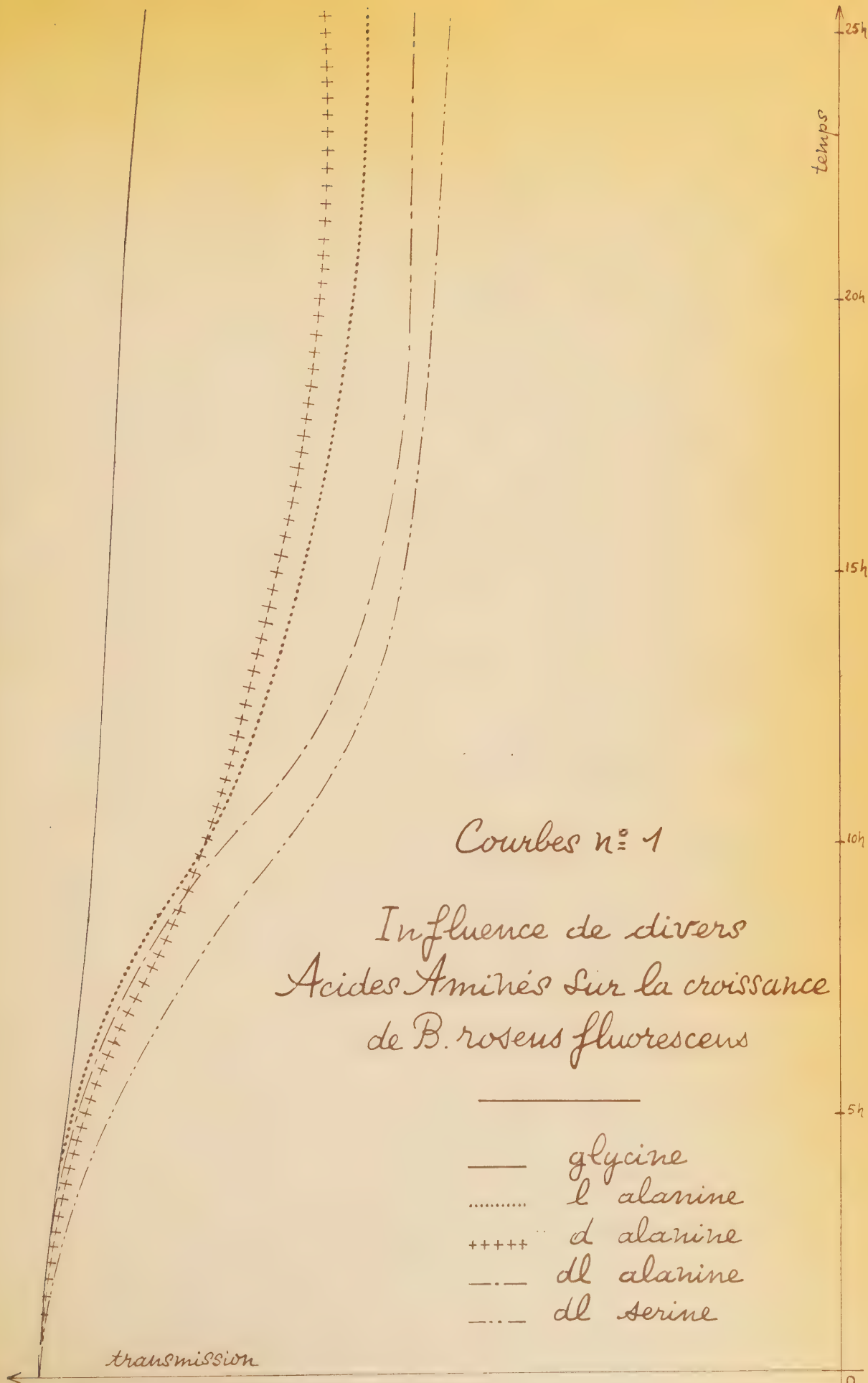
Nous avons laissé le biophotomètre fonctionner des temps variant entre 25 et 28 heures.

RESULTATS:

L'enregistrement au biophotomètre de la croissance de *B. roseus fluorescens* en présence d'un seul acide aminé, fournissant à la fois le carbone et l'azote nécessaires, nous

Courbes n° 1

Influence de divers
Acides Aminés Sur la croissance
de *B. roseus fluorescens*



temps

30h

15h

Courbes n° 2

Influence de divers
Acides Aminés Sur la croissance
de *B. roseus fluorescens*

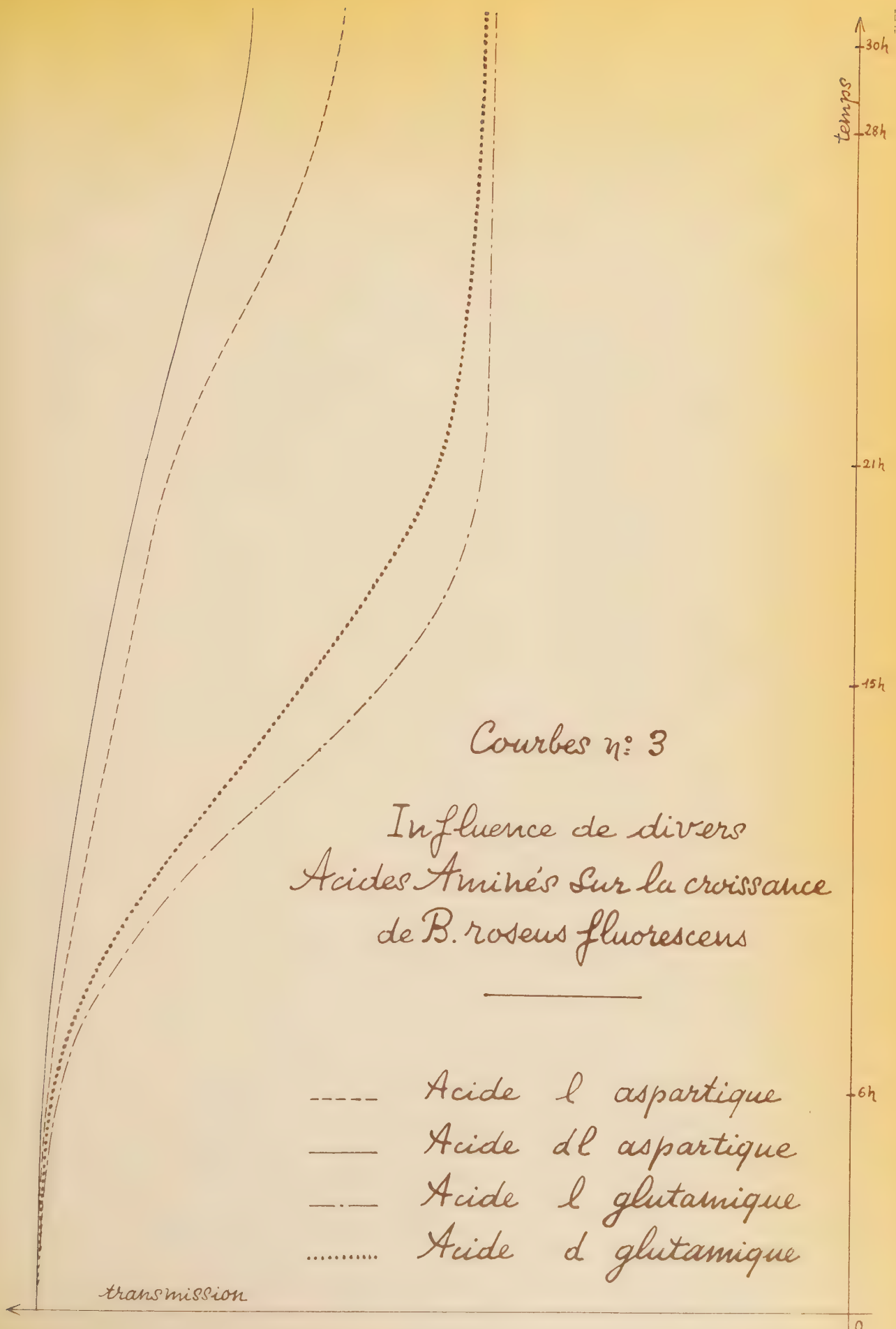
_____ l leucine

----- l valine

_____ l methionine

transmission

0



Courbes n° 3

Influence de divers
Acides Aminés Sur la croissance
de *B. roseus fluorescens*

- Acide L aspartique
- Acide DL aspartique
- . - . - Acide L glutamique
- Acide D glutamique

temps
30h
28h
26h

15h

Courbes n° 4

Influence de divers
Acides Aminés sur la croissance
de *B. roseus fluorescens*

-
- | | | |
|-------|---|---------------|
| | l | arginine |
| ----- | d | arginine |
| ----- | l | phénylalanine |
| ----- | l | histidine |
| ----- | l | tryptophane |

transmission

a donné une série de courbes dont nous donnons la reproduction (courbes n° 1, 2, 3, 4).

D'après ces courbes, nous pouvons classer par ordre décroissant les acides aminés étudiés, selon leur capacité d'être utilisés par *B. roseus fluorescens*:

acide l-glutamique
acide d-glutamique
dl-sérine
dl-alanine
l-alanine
d-alanine
l-histidine
l-arginine
d-arginine
acide l-aspartique
l-tryptophane
acide dl-aspartique
glycine
l-leucine
l-valine
l-méthionine et l-phénylalanine
β alanine

Si nous comparons certaines courbes, où la croissance maxima de *B. roseus fluorescens* est identique ou presque, après 25 à 30 heures (acides l- et d-glutamiques, dl-sérine et dl-alanine, l-histidine et l-arginine), nous voyons que la principale différence réside dans le départ de la croissance bactérienne.

La forme "l" de l'acide glutamique permet un départ plus rapide de la croissance de *B. roseus fluorescens*, que la variété "d"; de même, la dl-sérine est plus favorable à un départ rapide de croissance que la dl-alanine.

Etant donné que la même densité optique est obtenue après 30 heures, il semble que *B. roseus fluorescens* s'adapte déjà au milieu dans lequel il vient d'être mis, avant de pouvoir utiliser ce milieu pour son développement. Cette adaptation se traduirait donc par un retard du germe pour atteindre sa croissance maxima.

En dehors de ces quelques cas, la lecture des courbes nous montre bien par les différences dans le départ de la croissance et dans les densités optiques maxima obtenues, que *B. roseus fluorescens* utilise différemment chaque amino-acide.

La constitution de chaque acide aminé ne semble pas jouer ici un rôle aussi important que dans la désamination, comme nous le verrons dans des expériences

ultérieures. Si les acides l- et d-glutamiques sont utilisés et permettent une croissance rapide, les acides aspartiques viennent loin derrière des acides aminés monocarboxylés tels que la sérine, l'alanine ou l'arginine.

La longueur de la chaîne unie au groupement aminé ne semble pas non plus jouer un rôle important, puisque, dans notre classification, la glycine voisine avec la leucine et la valine.

B. roseus fluorescens est capable d'assimiler des acides aminés de **structure** assez complexe: chaîne à résidus guanidiques (arginine), noyau imidazolique (histidine) ou indolique (tryptophane). Nous noterons, par contre, la non-utilisation de l'acide aminé à noyau benzénique (phénylalanine).

Influence du pouvoir rotatoire des acides aminés:

Ph. LASSEUR et ses collaborateurs (318, 319, 320), étudièrent en 1943 l'influence des isomères optiques des acides aminés, sur la croissance de diverses bactéries chromogènes. Utilisant un milieu contenant de la glycérine en plus de l'acide aminé, ils purent étendre leurs conclusions à l'influence de la forme optique de l'acide aminé sur la chromogénèse. Ils montrèrent qu'il existe une relation entre le pouvoir alimentaire et l'utilisation d'un isomère optique, et que l'acide aminé, favorisant le plus la croissance d'un type dissocié, n'est pas forcément la source d'azote la plus adaptée à la chromogénèse.

Les expériences effectuées pour mettre en évidence l'influence des acides aminés sur la croissance de *B. roseus fluorescens*, nous ont donné les résultats suivants:

- les formes "l" des acides aspartique et glutamique, ainsi que celle de l'arginine se sont montrées plus favorables à la croissance de *B. roseus fluorescens* que les formes "d" ou les formes racémiques.
- avec l'alanine, nous notons, au contraire, que la forme racémique a une influence plus nette sur la croissance de ce germe que la forme "l".

Dès la fin de nos expériences, nous mesurons le pH de chacun des liquides nutritifs. En effet, toute consommation des acides incorporés, se traduit par une élévation du pH d'autant plus forte que le métabolisme est plus intense.

Nous avons obtenu les résultats suivants:
(le pH de départ étant uniformément de 6,9)

acide l-glutamique	7,25
acide l-aspartique	7,2
acide dl-aspartique	7,2
l-arginine	7,2
d-arginine	7,2
l-histidine	7,2
l-alanine	7,1
d-alanine	7,1
dl-alanine	7,1
dl-sérine	7,1
acide d-glutamique	7,1
l-leucine	7
l-phénylalanine	7
glycine	6,9
β alanine	6,9
l-valine	6,9
l-méthionine	6,9
l-tryptophane	6,9

Tout semble indiquer que, dans ces conditions et quel que soit l'acide aminé utilisé, le pouvoir tampon de la solution de base ait persisté, empêchant toute modification ultérieure importante du pH.

2°- DESAMINATION DE CERTAINS ACIDES AMINES PAR DES SUS- PENSIONS DE B. ROSEUS FLUORESCENS.

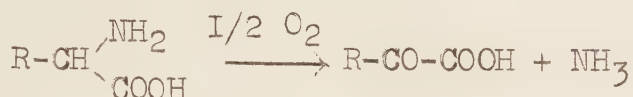
B. roseus fluorescens doit transformer certains acides aminés en substances diverses, plus facilement assimilables et servant à la synthèse des constituants de son cytoplasme ou de son appareil nucléaire.

La dégradation des acides aminés peut se faire selon différentes voies (désamination, décarboxylation, transamination); la désamination en est la principale et c'est elle qui nous a retenue plus particulièrement.

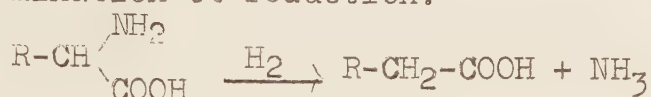
On peut, in vitro, décrire trois processus différents

de désamination d'un acide α -aminé:

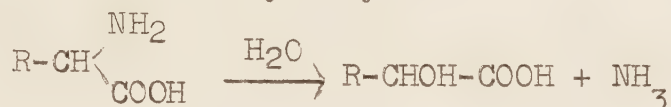
1) désamination et oxydation:



2) désamination et réduction:



3) désamination et hydrolyse:



Les travaux de EMBDEN, NEUBAUER, de KNOPP et de KREBS ont montré que dans les organismes animaux, la désamination des acides α -aminés était pratiquement toujours effectuée par oxydation, avec formation d'acide cétonique et d'ammoniac. La formation d'acide-alcool mise parfois en évidence, n'est pas la conséquence d'une désamination avec hydrolyse, mais de la réduction de l'acide cétonique formé.

Chez les Bactéries, le mode de désamination dépend du type bactérien lui-même, des conditions dans lesquelles on opère, et de la nature même de l'acide aminé (en particulier de la longueur de la chaîne reliée à la fonction amine). C'est ainsi que Esch. coli désamine l'alanine, la sérine, la cystéine, le tryptophane et l'acide glutamique selon la voie oxydative, tandis que la désamination de l'acide aspartique se fait par désaturation avec libération d'acide fumarique (QUASTEL et WOOLF - 321).

Nous nous sommes proposée de déterminer le pouvoir de désamination de *B. roseus fluorescens*. Quelle que soit la voie empruntée, la désamination se traduit par une libération d'ammoniac. Nous pouvons donc calculer la quantité d'acide aminé désaminé en déterminant l'ammoniac formé dans les cultures microbiennes. Nous avons, dans ce but:

1) dosé l'ammoniac formé après culture en milieu tampon,

2) utilisé l'appareil de Warburg.

A) DOSAGE DE L'AMMONIAC FORMÉ DANS LES CULTURES:

Matériel utilisé:

1° une solution tampon phosphate de pH=6,9 ,de composition identique à celle utilisée pour l'étude de la croissance (p. 82)

2° des solutions aqueuses stériles d'acides aminés M/50 et amenées à pH=6,9.

Protocole

Une culture de *B. roseus fluorescens* sur gélose, âgée de 24 heures, est lavée à l'eau physiologique et mise en suspension dans ce même véhicule.

Nous réalisons dans des tubes à essais stériles, le mélange suivant:

- 7 ml de solution tampon phosphate de pH=6,9
- 2 ml de solution d'acide aminé M/50
- 1 ml de suspension bactérienne.

Nous effectuons un témoin en mélangeant 1 ml de suspension microbienne à 9 ml de solution tampon. Ce tube sert au dosage de l'ammoniac pouvant se former éventuellement sans l'acide aminé, à partir de la culture. Toutes les séries de tubes sont alors placées à l'étuve à 25°C pendant 3, 4 et 10 jours, puis retirées pour doser l'ammoniac formé, sauf les tubes correspondant à la l-arginine et à la l-histidine, que nous abandonnons à l'étuve durant 3, 6, 24, 48 heures et 3 jours. Nous avons, en effet, remarqué dans des expériences ultérieures, que la désamination de ces acides aminés était complète après 3 jours de culture. C'est pourquoi nous avons effectué des dosages après des temps de contact plus courts.

Dosage de l'ammoniac

Ce dosage a été effectué selon une méthode dérivée de celle de FOREMAN et préconisée par RAYNAUD et GROS (203), qui est la suivante:

A 2 ml de culture microbienne bien agitée, on ajoute 5 à 10 ml d'alcool à 95° et quelques gouttes de thymol-phtaléine.

La prise d'essai est ensuite additionnée goutte à goutte d'une solution de soude N/50 jusqu'à apparition d'une coloration bleue, ce qui correspond à un pH de 10 environ.

On dose alors l'ammoniac selon la méthode de Parnas, en se servant d'alcool comme liquide de rinçage.

L'entraînement ne doit pas durer plus de dix minutes. En respectant ainsi les conditions de durée de l'opération et de pH, les amino-acides restant dans la culture ne sont pratiquement pas désaminés. L'ammoniac entraîné est dosé volumétriquement avec une solution titrée d'acide sulfurique N/100 en présence d'alizarine sulfo-conjuguée. D'après le résultat obtenu, nous déduisons la quantité d'acide aminé désaminé.

Nous savons en effet que:

1 litre d'acide N correspond à 17 g. de NH_3 , soit:

- une molécule-gramme d'acide monoaminé
- une demie molécule-gramme d'acide diaminé

Connaissant la teneur originelle en acide aminé et la quantité désaminée, nous pouvons donc calculer le pourcentage d'acide aminé désaminé par *B. roseus fluorescens* dans ces conditions d'expérience.

Nous avons groupé nos résultats dans les tableaux I et II et tracé quatre séries de courbes (n° 5, 6, 7, 8). Les acides aminés ont été placés selon leur classification, sauf pour l'arginine et l'histidine qui, du fait de la rapidité de leur désamination, ont nécessité un tableau et des courbes séparées.

Si nous prenons la glycine, acide aminé de structure la plus simple, comme point de départ, nous voyons que l'introduction de nouveaux radicaux, modifiant la longueur de la chaîne conduisant au groupement aminé, diminue chez *B. roseus fluorescens*, son pouvoir de désamination.

L'introduction d'une fonction acide (aspartate, glutamate) ou d'une fonction alcool (sérine), favorise au contraire cette désamination. Si la présence de groupements sulfurés (cystéine, méthionine) ou du noyau benzénique (phénylalanine) diminue ce métabolisme, l'existence du noyau indolique (tryptophane), imidazolique (histidine) et des résidus guanidiques de l'argi-

- TABLEAU N° I -
=====

DESAMINATION D'UNE SERIE D'AMINO-ACIDES par B. ROSEUS FLUORESCENS

	3 jours	4 jours	10 jours
Glycine $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \diagup \\ \text{CH}_2 - \text{C} \\ \diagdown \\ \text{NH}_2 \end{array}$	34 %	34 %	62,5 %
l- Alanine $\text{CH}_3 \cdot \text{CH} \begin{array}{c} \diagup \text{COOH} \\ \diagdown \text{NH}_2 \end{array}$	14,5%	15 %	29 %
d-Alanine	44 %	47 %	52 %
dl-Alanine	57 %	70 %	70 %
béta-alanine	31 %	56 %	58,4%
l-Valine $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \rangle \text{CH} \cdot \text{CH} \begin{array}{c} \diagup \text{COOH} \\ \diagdown \text{NH}_2 \end{array}$	12 %	15,5 %	31 %
l-Leucine $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \rangle \text{CH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH} \begin{array}{c} \diagup \text{COOH} \\ \diagdown \text{NH}_2 \end{array}$	9,6 %	13,5 %	21 %
Acide l-aspartique $\text{COOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH} \begin{array}{c} \diagup \text{COOH} \\ \diagdown \text{NH}_2 \end{array}$	86 %	96 %	100 %
Acide dl-aspartique	41 %	44 %	51 %
Acide l-glutamique $\text{COOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH} \begin{array}{c} \diagup \text{COOH} \\ \diagdown \text{NH}_2 \end{array}$	62,5 %	59 %	80 %
Acide d-glutamique	44 %	53 %	57 %

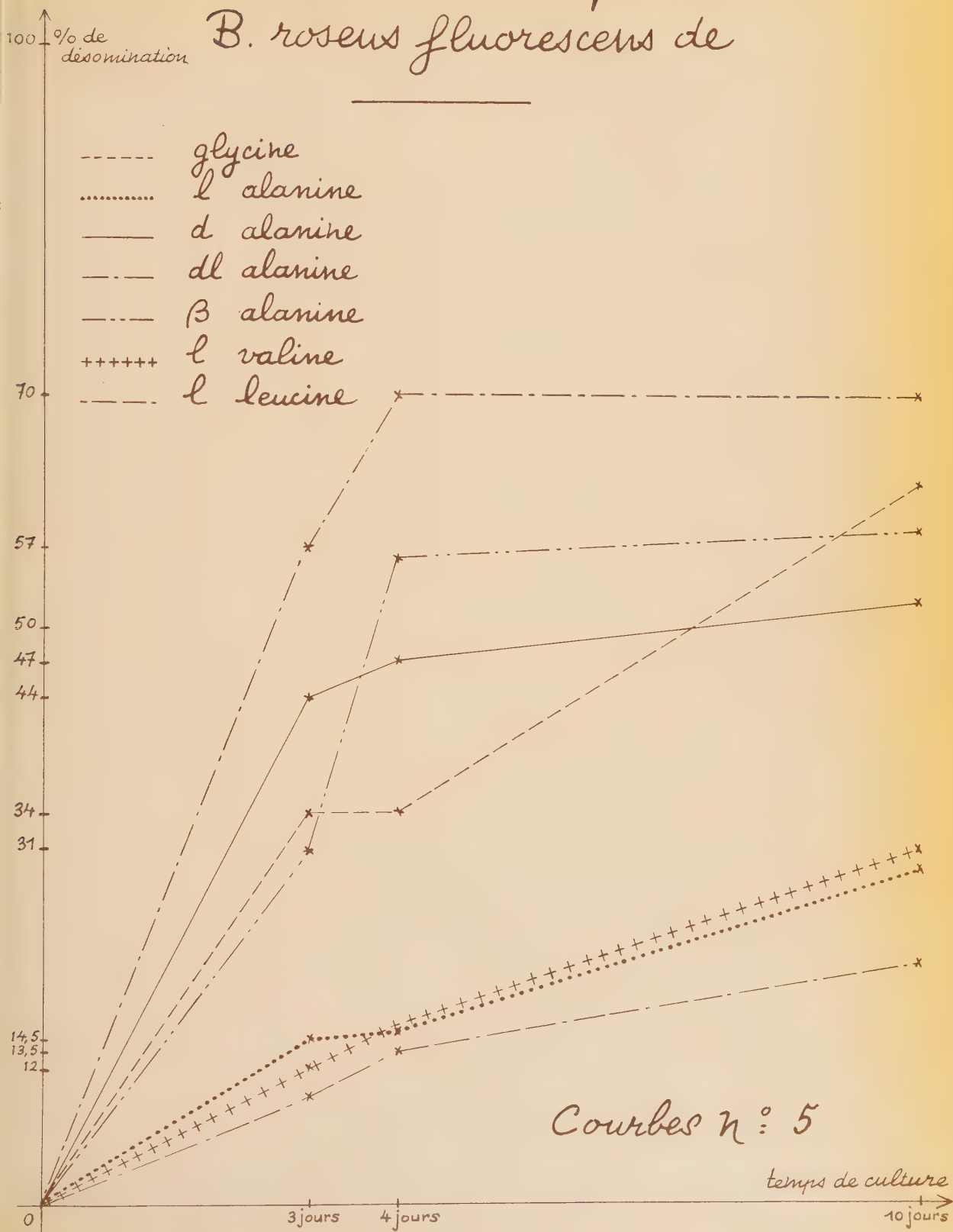
- TABLEAU N° II -

DESAMINATION D'UNE SERIE D'AMINO-ACIDES par B. ROSEUS FLUORESCENS

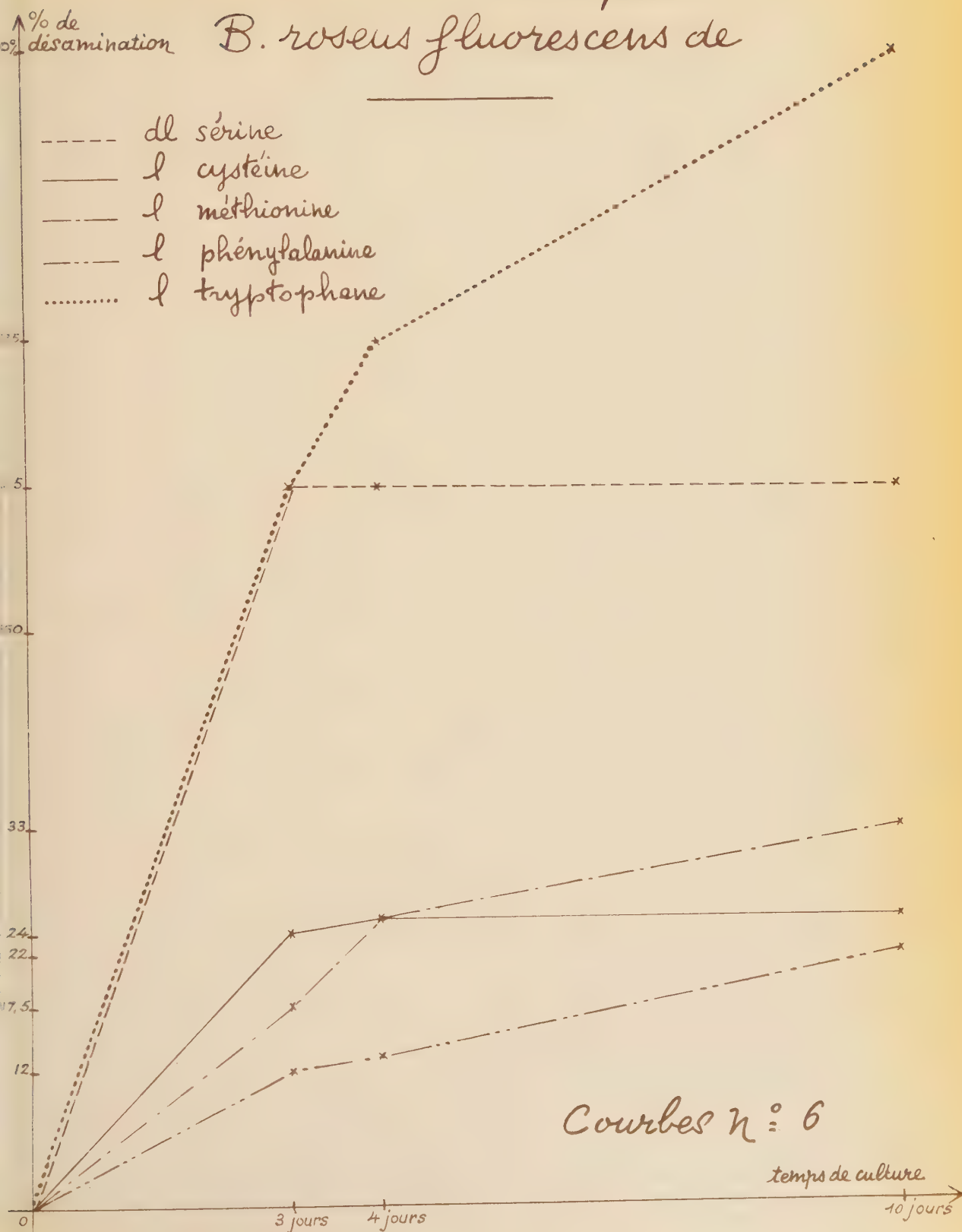
	3 jours	4 jours	10 jours
dl-Sérine $\text{CH}_2\text{OH} \cdot \text{CH} \begin{matrix} \nearrow \text{COOH} \\ \searrow \text{NH}_2 \end{matrix}$	62,5 %	62,5 %	62,5 %
l-Cystéine $\text{SH} \cdot \text{CH}_2 - \text{CH} \begin{matrix} \nearrow \text{COOH} \\ \searrow \text{NH}_2 \end{matrix}$	24 %	25 %	25 %
l-Méthionine $\text{S} \cdot \text{CH}_2\text{CH}_2 \cdot \text{CH} \begin{matrix} \nearrow \text{COOH} \\ \searrow \text{NH}_2 \end{matrix}$ CH_3	17,5 %	25 %	33 %
l-Phénylalanine  $\text{CH}_2 \cdot \text{CH} \begin{matrix} \nearrow \text{COOH} \\ \searrow \text{NH}_2 \end{matrix}$	12 %	13 %	22 %
l-Tryptophane  $\text{CH}_2 - \text{CH} \begin{matrix} \nearrow \text{COOH} \\ \searrow \text{NH}_2 \end{matrix}$	62,5 %	75 %	100 %

	3 h.	6 h.	24 h.	48 h.	3 j.	4 j.	10 j.
l Arginine $\text{NH} = \text{C} \begin{matrix} \nearrow \text{NH}_2 \\ \searrow \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{CH} \begin{matrix} \nearrow \text{COOH} \\ \searrow \text{NH}_2 \end{matrix} \end{matrix}$	3 %	5 %	36 %	57 %	100%		
d- Arginine	3 %	5 %	28 %	51 %	61%	92 %	100 %
l- Histidine  $\text{CH}_2 - \text{CH} \begin{matrix} \nearrow \text{COOH} \\ \searrow \text{NH}_2 \end{matrix}$	6 %	7 %	43 %	100 %			

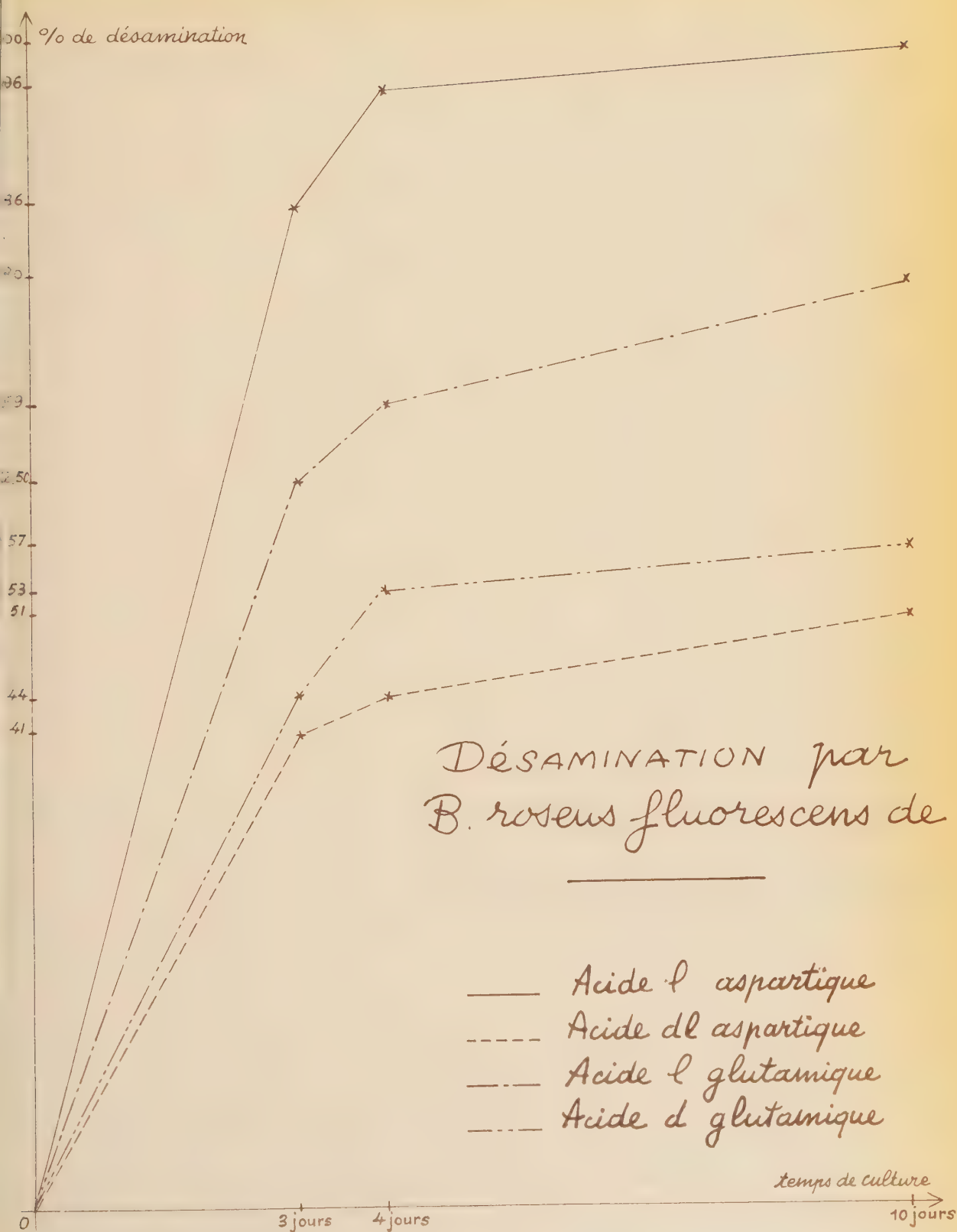
DÉSAMINATION par B. roseus fluorescens de

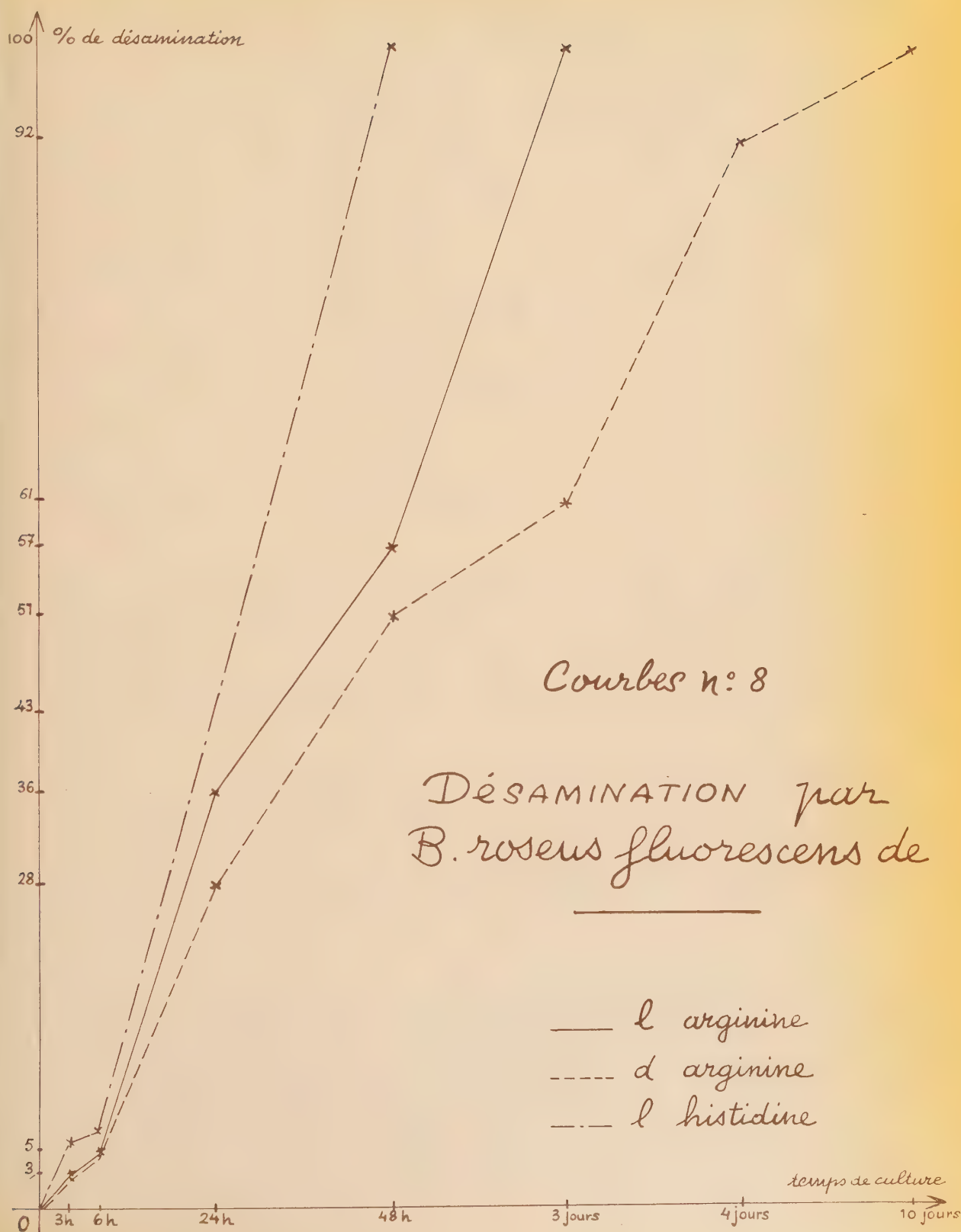


DÉSAMINATION par *B. roseus fluorescens* de



Courbes n°7





nine, le favorisent, au contraire.

Nous pouvons donc classer par ordre décroissant les acides aminés étudiés selon leur aptitude à être désaminé par *B. roseus fluorescens*:

- l-histidine
- l-arginine
- acide l-aspartique
- d-arginine
- l-tryptophane
- acide l-glutamique
- dl-alanine
- dl-sérine
- glycine
- acide d-glutamique
- d-alanine
- d-alanine
- acide dl-aspartique
- l-méthionine
- l-valine
- l-alanine
- cystéine
- phénylalanine
- l-leucine

J.G. MARCHAL et T. MITTWER (186) étudièrent en 1950 l'utilisation des acides aminés par *B. roseus fluorescens*. Cultivant ce germe sur un milieu L₇ où ils remplaçaient l'asparagine par l'acide aminé à étudier, à raison de 0,30 g.%, ils recherchèrent par la méthode chromatographique, en combien de jours l'amino-acide incorporé disparaissait du milieu de culture.

En comparant nos résultats avec ceux obtenus par ces auteurs, nous vérifions que *B. roseus fluorescens* désamine plus facilement les acides aminés que J.G. MARCHAL et T. MITTWER avaient trouvé être les plus rapidement assimilés par ce germe. De même, la valine, la leucine, la cystéine, qui, dans leurs essais, n'étaient que peu utilisées, sont également très faiblement désaminées.

Nos résultats sont différents en ce qui concerne l'attaque par *B. roseus fluorescens* de la l-histidine: J.G. MARCHAL et T. MITTWER observèrent la disparition de cet amino-acide après huit jours de culture, tandis que dans nos expériences, sa désamination s'effectue dans de très brefs délais.

La l-arginine est également très rapidement désa-

minée par ce germe, tandis que la d-arginine (seule forme optique essayée par ces auteurs), l'est complètement après 10 jours, ce qui correspond aux résultats qu'ils trouvèrent.

Pour expliquer la différence de l'attaque par *B. roseus fluorescens* de la l-histidine, nous ne devons pas perdre de vue que nos conditions d'expérience sont tout à fait différentes de celles de ces auteurs. Nous avons opéré dans un milieu tampon phosphaté ne contenant que l'acide aminé comme source de carbone et d'azote. Par contre, J. G. MARCHAL et T. MITTWER employaient un milieu synthétique complexe contenant, outre l'acide aminé, de la glycérine, des ions Ca^{++} , Mg^{++} et Fe^{++} .

B) UTILISATION DE L'APPAREIL DE WARBURG

La technique manométrique de Warburg permet, non seulement d'étudier la respiration bactérienne en présence de divers substrats, mais aussi de rechercher les produits élaborés durant les expériences. Comme nous l'avons déjà signalé, elle est basée sur la loi de Mariotte. La culture bactérienne est placée dans un volume clos connu et il est possible d'en déterminer quantitativement la respiration, en mesurant les variations de pression à volume constant.

Les résultats obtenus relatifs à l'utilisation par *B. roseus fluorescens* de divers acides aminés pour sa croissance, et à la dégradation par désamination de ces composés, nous ont conduit à rechercher l'influence sur la respiration de cette bactérie de quelques-uns de ces amino-acides. L'emploi de la technique manométrique de Warburg nous a permis, non seulement cette étude, mais aussi le dosage de l'ammoniac formé par désamination de l'acide aminé présent. Dans toutes ces expériences, nous n'avons mesuré que la consommation en oxygène, le gaz carbonique dégagé étant absorbé par une solution de potasse à 10%.

Matériel nécessaire

Nous utilisons une solution tampon phosphate de $\text{pH}=7,4$, que nous préparons en mélangeant à 8 volumes d'une solution aqueuse de phosphate disodique à 11,87g.%, 2 volumes d'une solution aqueuse de phosphate monopotassique à 9,07 g. % .

Nous réalisons, d'autre part, des solutions aqueuses d'acides aminés, de concentration $\text{M}/10$, que nous amenons à un pH de 7,4 et que nous stérilisons par filtra-

tion sur bougie L₃.

Nous avons employé les cinq acides aminés suivants:

- 1) la glycine, qui présente la structure la plus simple.
- 2) la l-alanine, dont nous avons remarqué le faible taux de désamination et la présence constante dans les produits élaborés par *B. roseus fluorescens* lors d'expériences que nous exposons ultérieurement (Chapitre II).
- 3) la dl-sérine, acide aminé substitué, que nous ne retrouvons que dans certains cas, lors de ces mêmes expériences, (Chapitre II).
- 4) l'acide l-aspartique, dont nous avons observé la rapide désamination par *B. roseus fluorescens* et la présence dans deux cas bien déterminés, lors de nos recherches sur les acides aminés libres des milieux de culture de ce germe (Chapitre II).
- 5) l'acide l-glutamique, qui favorise particulièrement la croissance de *B. roseus fluorescens* et qui accompagne toujours l'alanine dans les produits élaborés par ce germe (Chapitre II).

Protocole

Une culture de *B. roseus fluorescens* sur gélose en boîte de Roux et âgée de 24 heures, est lavée plusieurs fois au moyen d'une solution de tampon phosphate de pH=7,4. Le dernier culot de centrifugation est mis en suspension très dense.

Dans chaque fiole de Warburg, on dépose:

- dans la cupule centrale: 0,2 ml de solution de potasse à 10%;
- dans le "side-arm" de la fiole: 0,3 ml de solution d'acide aminé M/10 (concentration finale en acide de M/100);
- dans la fiole elle-même: 2,7 ml de suspension bactérienne dans le tampon (soit environ 10⁹6 gammas d'azote bactérien).

Le bain-marie de l'appareil de Warburg étant réglé à 28°C, nous maintenons l'agitation des fioles durant quinze minutes, avant d'y verser le contenu du "side-arm".

Nous avons effectué la lecture des variations de pression toutes les quinze minutes. La respiration endogène normale (témoin) est mesurée dans une fiole où l'acide aminé du "side-arm" a été remplacé par 0,3 ml de solution tampon phosphate de pH=7,4.

a) Etude de la respiration et de la désamination de B. roseus fluorescens en présence de quelques acides aminés.

Les expériences ont duré 3 heures 15 minutes. Elles ont été réalisées, d'une part, en atmosphère normale, d'autre part, en atmosphère d'azote. Nous voulions, en effet, déterminer le rôle possible de l'oxygène sur la désamination. Nous donnons comme résultats (tableau n° III) la moyenne des chiffres obtenus au cours de diverses séries d'expériences. La quantité d'oxygène est exprimée en micromolécules et la recherche du pourcentage de désamination se fait en dosant l'ammoniac formé dans chaque fiole, selon la méthode de RAYNAUD et GROS précédemment indiquée (203), p. 87.

D'après ces résultats, nous voyons que la respiration de B. roseus fluorescens est plus élevée en présence d'acide glutamique qu'en présence des autres acides aminés essayés.

L'oxydation par B. roseus fluorescens des acides aminés que nous avons essayés se fait dans l'ordre décroissant suivant:

acide l-glutamique
dl-sérine
l-alanine
acide l-aspartique
glycine.

La désamination en atmosphère normale est, par contre, maximum pour la dl-sérine et la glycine, tandis qu'elle diminue ensuite pour les autres acides aminés (acide l-aspartique, l-alanine, acide l-glutamique).

En atmosphère d'azote, la désamination est nulle pour la l-alanine et pour l'acide l-glutamique.

Elle est diminuée d'environ 50% pour la dl-sérine et l'acide l-aspartique, et de 90% pour la glycine.

L'oxygène est donc absolument nécessaire pour que B. roseus fluorescens désamine l-alanine et l'acide glutamique. Son rôle est également important dans la désamination de la glycine, mais il est nettement réduit pour celles de la sérine et de l'acide aspartique.

- TABLEAU N° III -
=====

Respiration de B- roseus fluorescens et
désamination d'une série d'acides aminés sous l'influence de ce germe.

Etude à l'appareil de Warburg (en tampon phosphate de pH: 7,4).

Durée des expériences 3 h. 15	Oxygène consommé en . . . micromolécules	Pourcentage de désamination.	
	en atmosphère normale	en atmosphère normale	en atmosphère d'azote
Glycine	19,2	60 %	7,4 %
l Alanine	22,2	30,4 %	0
dl Sérine	23,3	63,2 %	32,2 %
Acide l aspartique	21,2	50,6 %	22,3 %
Acide l glutamique	25,8	25,6 %	0

b) Influence de l'arsénite de sodium sur la respiration et la désamination:

La désamination d'un acide aminé peut s'effectuer par la voie oxydative, ce qui entraîne la formation de l'acide cétonique correspondant que la bactérie peut utiliser par la suite.

La présence d'arsénite de sodium dans le milieu de culture, bloque cette réaction et empêche la dégradation ultérieure du céto-acide.

Nous avons donc essayé d'étudier l'influence de l'arsénite sur l'oxydation de divers acides aminés par *B. roseus fluorescens*.

Nous avons utilisé des solutions d'arsénite telles que les concentrations finales soient de M/30 et M/1000 dans chaque fiole de l'appareil de Warburg.

Nous introduisons dans chaque fiole 0,3 ml d'une solution d'arsénite de titre convenable, tandis que la quantité de suspension microbienne est réduite à 2,4 ml (ces 2,4 ml apportent autant de germes que les 2,7 ml utilisés lors des expériences précédentes sur la désamination).

Pour les témoins - qui ne contiennent pas d'arsénite - nous ajoutons aux 2,4 ml de suspension bactérienne, 0,3 ml de solution tampon stérile.

Nous résumons les résultats obtenus dans le tableau n° IV, où nous indiquons la consommation moyenne en oxygène, exprimée en micromolécules, et le pourcentage de désamination pour des concentrations finales en arsénite de M/30 et M/1000.

RESULTATS:

Du tableau n° IV, nous pouvons tirer les conclusions suivantes:

I) Influence de l'arsénite sur la respiration de *B.roseus fluorescens* en présence de quelques acides aminés

L'arsénite est capable d'inhiber la respiration cellulaire: une concentration en arsénite de M/1000 inhibe la consommation en oxygène de *B.roseus fluorescens* d'une façon totale en présence de glycine et très fortement avec la dl-sérine. Elle n'a qu'une action très faible en présence des acides l-aspartique, l-glutamique et de la l-alanine.

L'inhibition de la respiration de *B.roseus fluores-*

- TABLEAU N° IV -

=====

Influence de l'arsénite de Sodium sur la respiration et la désamination
(*B.roseus fluorescens*)

1°: Arsénite de Sodium en concentration finale $\frac{M}{1000}$

Durée des expériences 3 h.15	Consommation en oxygène exprimée en micromolécules		% inhibition.	Pourcentage de désamination		% inhibition	% activation
	normal	arsénite M/1000		normal	arsénite M/1000		
Glycine	17,3	0	100 %	62 %	7 %	88 %	-
Alanine	20,4	20,1	1 %	31 %	65 %	-	52 %
11 Sérine	20,8	7,8	62 %	63 %	68 %	-	7 %
acide 1 aspartique	19,1	15,8	17 %	45 %	43 %	4 %	-
acide 1 glutamique	23,8	19,6	17 %	25 %	22 %	12 %	-

2°: Arsénite de Sodium en concentration finale $\frac{M}{30}$

Durée des expériences 3 h.15	Consommation en oxygène exprimée en micromolécules		% inhibition	Pourcentage de désamination		% inhibition
	normal	arsénite M/30		normal	arsénite M/30	
Glycine	19,3	0	100 %	55,8 %	0	100 %
Alanine	24,1	5,4	78 %	29,8 %	26,1 %	12 %
11 Sérine	26,3	1,1	96 %	69,5 %	28,5 %	59 %
acide 1 aspartique	24,9	1,5	97 %	54,9 %	21. %	61 %
acide 1 glutamique	29,2	3,1	89 %	32,3 %	9 %	72 %

cens est, par contre, totale lorsque l'arsénite atteint une concentration finale égale à M/30.

2) Influence de l'arsénite sur la désamination de quelques acides aminés par B. roseus fluorescens

NISMAN et ses collaborateurs (347, 348, 349) montrèrent que, chez les bactéries anaérobies strictes, l'arsénite de sodium était un inhibiteur spécifique des acidamino-réductases.

D'après nos résultats, l'arsénite en concentration M/1000 inhibe totalement la désamination de la glycine et faiblement celle des acides l-aspartique et l-glutamique. Il active, par contre, celle de la l-alanine et de la l-sérine.

NISMAN (347) avait déjà remarqué que, dans la désamination couplée (réaction de Stickland) par les Bactéries anaérobies, l'arsénite en solution M/1000 n'empêchait pas la désamination du substrat donateur (alanine) mais qu'il inhibait l'enzyme capable de réduire l'acide aminé récepteur d'hydrogène (glycine).

Ceci pourrait peut-être expliquer les résultats que nous avons obtenus et plus précisément le fait que l'arsénite de sodium en solution M/1000 inhibe la désamination de la glycine sans modifier celle des acides aminés dicarboxyliques. Il active, au contraire, la désamination de l'alanine; nous n'avons, jusqu'à présent, trouvé aucune explication à ce sujet.

En concentration plus forte (M/30), l'arsénite inhibe la désamination de tous les acides aminés essayés.

B. roseus fluorescens possède donc les déshydrases nécessaires à la désamination de tous les acides aminés testés.

3°- LA TRANSAMINATION CHEZ B. ROSEUS FLUORESCENS

D. NEEDHAM (256) signalait en 1930 que, dans le muscle de pigeon, les acides aspartique et glutamique peuvent donner naissance à des diacides non azotés sans formation d'ammoniaque, ni d'urée, et sans variation de la teneur totale en azote aminé. Il ne peut donc s'agir que d'un transport du groupe aminé.

En 1937, BRAUNSTEIN et KRITZMANN, reprenant systématiquement cette étude, démontraient l'existence, dans le

muscle de pigeon, d'un système diastasique déterminant le transfert du groupe aminé d'un amino-acide sur un acide α cétonique et réciproquement. Ils décrivaient ce nouveau processus du métabolisme aminé sous le nom de TRANSAMINATION.

Les premiers travaux concernant la transamination ont porté sur les animaux, et selon COHEN (257), ce processus n'était le propre que de trois acides aminés (glutamate, aspartate, alanine). Par la suite, en collaboration avec BRAUNSTEIN (258), il avait été conduit à penser que seuls les acides L-aminés étaient justiciables de ce métabolisme, tandis que CEDRANGOLO et CARADANTE (259) établissaient que la forme "D" des acides aminés pouvait également être l'objet de transaminations.

En ce qui concerne les Bactéries, les premières recherches furent faites en 1938 par EULER et ses collaborateurs sur *Esch. coli* (260). LICHSTEIN et COHEN (261) démontrèrent que non seulement les cellules bactériennes sont capables de transamination, mais encore que cette réaction s'y effectue avec une intensité plus grande que celle observée dans les cellules des animaux et des végétaux.

Une différence existerait cependant entre les Bactéries et les organismes plus évolués, car, dans les réactions de transamination qui s'effectuent chez les micro-organismes, la vitamine B₆ aurait un rôle de coenzyme beaucoup moins important.

L'étude de la transamination chez *B. roseus fluorescens* a déjà fait l'objet d'une publication (262). Nous y avons établi l'existence des réactions suivantes:

aspartate + α cétooglutarate $\xrightleftharpoons{\hspace{1cm}}$ glutamate + oxaloacétate

glutamate + pyruvate $\xrightleftharpoons{\hspace{1cm}}$ alanine + α cétooglutarate

Il en résulte que *B. roseus fluorescens* est capable de transamination. Nous avons essayé de pousser plus avant ces investigations, en remplaçant l'aspartate, le glutamate, et l'alanine par d'autres amino-acides et nous avons cherché à observer l'éventuelle formation de glutamate ou d'alanine.

PROTOCOLE

Ainsi que nous l'avons fait dans nos essais précédents (262), nous utilisons la chromatographie sur papier, comme

moyen de recherche des acides aminés formés.

Nous réalisons plusieurs séries d'expériences en mélangeant une certaine quantité d'acides pyruvique ou α céto-glutarique à l'un des acides aminés suivants:

glycine
l-valine
l-leucine
l-méthionine
l-phénylalanine
l-tryptophane
l-histidine

Avec chacun de ces systèmes, nous effectuons des séries de tubes, selon le protocole suivant:

- 0,3 ml de solution stérile d'acide aminé M/5 ajustée à pH=6,9 (soit 60 micromolécules)
- 0,3 ml de solution stérile d'acide cétonique M/5 ajustée à pH=6,9 (soit 60 micromolécules)
- 1,4 ml de suspension microbienne effectuée dans une solution tampon phosphate de pH=6,9

Cette solution tampon est la même que celle utilisée dans nos études sur la désamination (p.82,87)

Le matériel d'ensemencement est fourni par une culture de *B.roseus fluorescens*, âgée de 24 heures et effectuée sur gélose en boîte de Roux. Les germes sont lavés plusieurs fois au moyen de la solution tampon de pH=6,9 et mis en suspension dans ce même véhicule de façon que 1 ml de cette suspension contienne environ 1 mg d'azote bactérien.

Les tubes sont placés à l'étuve à 25°C, et retirés après 2,4,6,8,24 et 30 heures de contact. Chaque tube est additionné d'un égal volume d'alcool à 95° et centrifugé. Le liquide surnageant est alors chromatographié selon les techniques générales indiquées (méthode ascendante): nous employons comme papier le papier Schleicher et Schull 2.403 A et comme solvant, le phénol ammoniacal en atmosphère saturée d'eau, de phénol et de cyanure, (durée de la chromatographie: 16 heures).

La révélation est effectuée par une solution de ninhydrine dans le butanol.

Avec chaque série, nous effectuons les témoins suivants:

- 1) acide aminé seul
- 2) acide cétonique seul
- 3) germes seuls

afin de vérifier l'éventuelle formation d'acides aminés, autrement que par transamination.

RESULTATS

La révélation des chromatogrammes par la ninhydrine nous a permis de mettre en évidence les spots correspondants à divers acides aminés. Nous avons observé:

- 1) la formation d'alanine, lorsque l'acide pyruvique était additionné à la solution en même temps que l'un des acides aminés suivants:

glycine
l-leucine
l-méthionine
acide l-glutamique
l-phénylalanine

- 2) la formation d'acide glutamique, lorsque l'acide pyruvique était additionné à la solution en même temps que l'un des acides aminés suivants:

l-valine
l-tryptophane

- 3) la formation d'acide glutamique, lorsque l'acide α cétooglutarique était additionné à la solution en même temps que l'un des acides aminés suivants:

glycine
l-alanine
l-valine (très faible)
l-leucine
acide l-aspartique
l-méthionine
l-phénylalanine
l-tryptophane

Les réactions de transamination sont très importantes avec:

l'acide l-glutamique
l'acide l-aspartique
la l-alanine

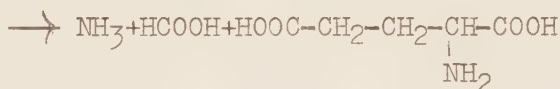
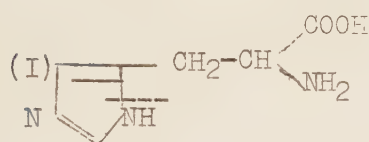
Elles sont moins prononcées avec les autres acides aminés, surtout avec la l-valine et le l-tryptophane qui

ne réagissent que très faiblement.

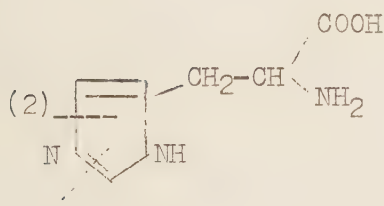
Nous n'avons pas pu établir de résultats quant à la transamination de la l-histidine par *B. roseus* fluorescens. Nous avons constaté que ce germe, ensemencé sur solution tampon phosphate de pH=6,9, élabore à partir de cet acide aminé à noyau hétérocyclique et en l'absence de tout acide cétonique, de l'acide glutamique en grande quantité.

Notons que TABOR et HAYAISHI (322) avaient déjà signalé cette production d'acide glutamique à partir d'histidine chez un *Pseudomonas fluorescens*.

L'élaboration d'acide glutamique est possible grâce à l'ouverture du cycle imidazolique. Deux possibilités d'ouverture de ce cycle ont été proposées; elles aboutissent toutes deux à la formation d'acide glutamique et d'acide formique, selon le schéma suivant:



acide formique acide glutamique



o
o o

- CHAPITRE II -
=====

ELABORATION D'ACIDES AMINES PAR B.ROSEUS FLUORESCENS
CULTIVE SUR DIVERS MILIEUX A BASE D'ACIDES ORGANIQUES.

Les méthodes d'analyse par chromatographie ou par électrophorèse permettant la séparation des différents acides aminés, ont rendu possibles de nouvelles recherches en Microbiologie.

Nombreux sont les auteurs qui étudièrent la composition des microorganismes en acides aminés, en fonction des différents milieux sur lesquels on les cultive. Citons les travaux de GODIN sur *Penicillium brevicompactum* (187), ceux de SIMONART sur *Aspergillus orizae* (188) et sur *Penicillium Charlesii* (189), ceux de NIELSEN sur *Rhodotorula gracilis* (190). La composition en acides aminés de *Corynebacterium diphtheriae* est maintenant connue (191). Il en est de même de celles de *Staphylococcus aureus* (53,192) et de *Hemophilus pertussis* (52), entre autres bactéries. De nouveaux acides aminés ont été trouvés (64, 193, 194), et les investigations restent très nombreuses dans ce domaine.

FROMAGEOT et ses collaborateurs (195) suivirent la variation des acides aminés du milieu servant à la culture de *Penicillium chrysogenum*, HIGAMATO fit de même avec *Hemophilus pertussis* (248), tandis que J.G. MARCHAL et T.MIT-TWER (186) établirent en combien de temps *B.roseus fluorescens* était capable d'assimiler et de faire disparaître du milieu de culture certains acides aminés.

Peu d'auteurs en fait, étudièrent la formation des acides aminés, sous l'influence de divers facteurs, dans le milieu même de culture et non dans la bactérie. Citons les travaux de SENEZ sur les bactéries sulfato-réductrices (199), de DAGLAY et de ses collaborateurs (197) sur *Esch. coli* et *Aerobacter aerogenes*, d'ABELSON (198) sur *Esch.coli*. DAGLAY a mis en évidence dans les cultures de *Esch.coli*, la présence d'histidine, d'acide aspartique, d'acide glutamique et d'alanine, tandis que ABELSON, grâce à l'emploi de substances marquées, suivit l'influence sur la genèse des amino-acides, de l'incorporation de pyruvate ou des composés du cycle tricarboxylique: cet auteur obtenait des ré-

sultats en accord avec l'existence possible du cycle tri-carboxylique chez la bactérie étudiée.

Nous nous sommes proposé de rechercher les acides aminés libres synthétisés par *B. roseus fluorescens*, à partir de substrats différents. Nous avons utilisé pour ces études, la chromatographie et l'électrophorèse sur papier, seules méthodes capables de nous permettre à la fois la séparation et l'identification de divers acides aminés, même si ceux-ci se trouvent en faibles quantités.

Avant de passer à nos expériences proprement dites, nous allons tout d'abord envisager le matériel utilisé lors de ces études (milieux de culture).

MATERIEL NECESSAIRE

1° MILIEUX DE CULTURE UTILISES

Nous avons réalisé le milieu de base suivant:

chlorure d'ammonium	0,72 g
phosphate dipotassique	0,25 g
sulfate de magnésium	0,50 g
chlorure de calcium	0,04 g
sulfate ferreux	0,01 g
eau bi-distillée	100 ml.

Ce milieu était réparti à raison de 7 ml par tube et stérilisé à 115°C durant 30 minutes.

Au moment de l'emploi, nous ajoutons à chaque tube une solution aqueuse des acides organiques ou cétoniques à étudier, solution stérilisée par filtration sur bougie L 3. Nous ne pouvons, en effet, stériliser à l'autoclave des acides tels que l'acide oxaloacétique ou l'acide α -cétoglutarique, sans craindre de les voir se décomposer.

Chacune de ces solutions d'acides était, au préalable, neutralisée par la quantité théorique de bicarbonate de sodium, de façon que, mélangée au milieu de base, le pH final soit de 6,1 à 6,4.

Les différents acides ou sels suivants ont été utilisés:

pyruvate de sodium	0,50 ml	d'une solution à	10%
acide oxaloacétique	0,40 ml	" "	15%
acide fumarique	0,50 ml	" "	10%
acide dl-malique	0,50 ml	" "	11,60%
acide α -cétoglutarique	0,50 ml	" "	9,80%
succinate d'ammonium	0,50 ml	" "	13%
acide citrique	0,50 ml	" "	14%

goutte 300 ml d'eau oxygénée à 20 volumes identiquement refroidie, (soit environ un atome d'oxygène), tout en agitant régulièrement et en surveillant attentivement la température; cette dernière n'a jamais dépassé + 5°C au cours de l'opération.

Dès l'addition des premières gouttes d'eau oxygénée, le mélange prend une coloration rouge bordeaux caractéristique.

Lorsque la totalité de l'eau oxygénée a été ajoutée, on verse très lentement 50 ml d'acide sulfurique concentré (soit le 1/10 du volume total), tout en maintenant le refroidissement; durant cette opération, la température n'a pas dépassé +9° C.

Le mélange est ensuite extrait à l'éther; les solutions éthérées donnent avec le chlorure ferrique une coloration rouge qui permet de suivre la marche de l'extraction: 1.500 ml d'éther ont été utilisés au total.

Les liqueurs éthérées décantées, abandonnent après évaporation, des cristaux incolores que surnage un liquide jaunâtre, à faible odeur acétique, vraisemblablement constitué par de l'acide pyruvique, dont la formation en petite quantité n'a pu être évitée.

Les cristaux sont essorés, lavés à l'eau distillée froide, puis séchés dans un exsiccateur en présence d'anhydride phosphorique.

Vérification de la pureté

- L'acide oxaloacétique ainsi obtenu se présente sous forme de petits cristaux incolores, solubles dans l'éther, l'acétone, peu solubles dans l'eau froide, facilement solubles dans l'eau chaude, mais en se décomposant avec formation d'acide pyruvique.

- Il fournit avec les solutions aqueuses étendues de sels ferriques une coloration rouge-sang intense, que ne modifient pas les acides minéraux dilués (l'acide pyruvique ne donne pas cette réaction).

- Chauffé en tube capillaire, dans un appareil de Thiele, il jaunit vers 127°C puis se décompose totalement à partir de 138°C, avec formation d'acide pyruvique et dégagement de gaz carbonique.

- Fusion instantanée au bloc Maquenne: 185°C avec décomposition.

Nous avons conservé l'acide oxaloacétique dans un flacon bien sec, bouchant à l'émeri et à basse température.

Ses solutions aqueuses ont été préparées extemporanément.

Tautomerie

L'acide oxaloacétique se présente sous trois formes:

1) forme cétonique: $\text{COOH} - \text{CO} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$

2) forme énolique, isomère cis ou acide hydroxymaléique:



3) forme énolique, isomère trans ou acide hydroxyfumari-
que:



K.H. MEYER (265) a étudié ces diverses variétés et conclu avec WOHL, que les deux formes énoliques sont cristallisées et présentent le même comportement vis à vis du brome.

En solution alcoolique, 60% du produit existe sous forme énolique, tandis qu'en solution aqueuse, 20% seulement est énolisé; dans ce cas, la solution aqueuse contiendrait 80% de forme cétonique vraie. Rappelons d'ailleurs que la solution aqueuse est instable.

D'après V. GRIGNARD (266), les points de fusion des 2 formes énoliques sont les suivants:

(variété cis 152°C

(variété trans 184°C

FENTON et WILKS (267) ainsi que WOHL considèrent que les sels normaux de l'acide oxaloacétique possèdent la forme cétonique, mais lorsqu'ils sont décomposés par les acides dilués, la variété la moins stable, c'est-à-dire la forme maléique, prend d'abord naissance, selon la règle d'Ostwald.

B) ACIDE CÉTOGLUTARIQUE

L'acide céto-glutarique, répondant à la formule suivante:



se prépare:

1° soit par condensation de l'oxalate d'éthyle avec le succinate d'éthyle en présence d'éthylate de sodium (249) ou de potassium (250);

2° soit par action d'acide chlorhydrique concentré sur l'ester triéthylé de l'acide oxalosuccinique (251, 252, 253);

3° soit par action des alcalis sur divers composés (acide α - γ dibromoglutarique, α bromoglutaconate d'éthyle, α - γ dibromoglutarate d'éthyle) - 254 -.

Toutes ces méthodes fournissent un rendement relativement faible; aussi nous avons utilisé le procédé indiqué par FRIEDMAN et KOSOWER (255) qui ne présente pas de notables difficultés et conduit à un excellent rendement.

Principe

Par condensation de l'oxalate d'éthyle avec le succinate d'éthyle, en présence d'éthylate de potassium, on obtient l'oxalosuccinate d'éthyle, dont l'hydrolyse donne naissance à l'acide α cétooglutarique, conformément aux schémas représentés dans le tableau n° V.

Technique

- Préparation de l'éthylate de potassium:

On découpe sous xylène anhydre 39,50 g. de potassium que l'on introduit après lavage convenable à l'éther anhydre dans un ballon à trois tubulures renfermant 650 ml de ce dernier solvant.

On réunit les différentes parties de l'appareil, met en marche l'agitateur, puis on ajoute par petites portions, à l'aide de l'ampoule à brome, 150 ml d'alcool absolu (l'addition doit durer 1 heure 30).

Lorsque la majeure partie de l'alcool a été introduite, on chauffe au bain-marie jusqu'à dissolution complète du potassium (environ deux heures), puis on laisse refroidir.

- Obtention de l'oxalosuccinate d'éthyle

Dans l'éthylate de potassium ainsi préparé, on verse rapidement par l'ampoule à brome, 146 g. d'oxalate d'éthyle en agitant; la solution, jaune clair initialement, devient jaune foncé. On poursuit l'agitation pendant 10 minutes avant d'introduire 174 g. de succinate d'éthyle. La cristallisation s'amorce à la fin de l'opération, et devient rapidement si abondante que le mélange se prend en masse.

Les cristaux sont alors recueillis, lavés à l'éther jusqu'à ce que les liqueurs de lavage soient incolores, puis dissous dans 270 ml d'eau auxquels on ajoute 100 ml d'acide chlorhydrique concentré. L'oxalosuccinate d'éthyle se sépare sous forme d'une huile surnageante que l'on extrait à

tableau n° V

Préparation de l'acide L cétooglutarique

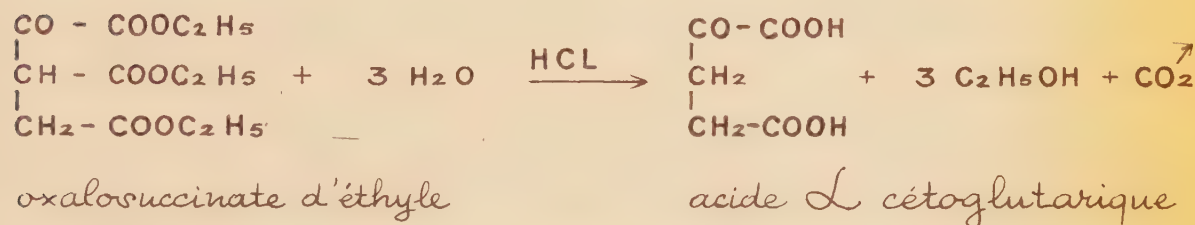
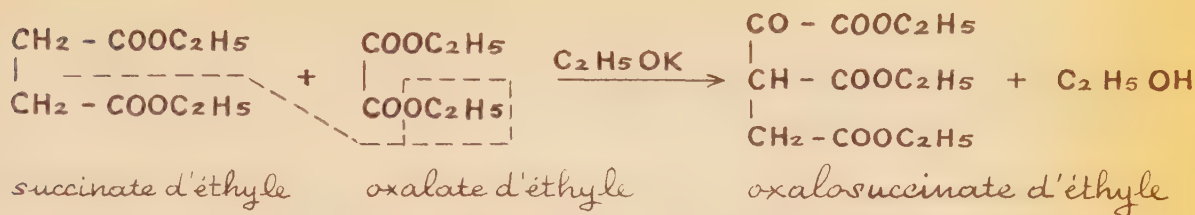
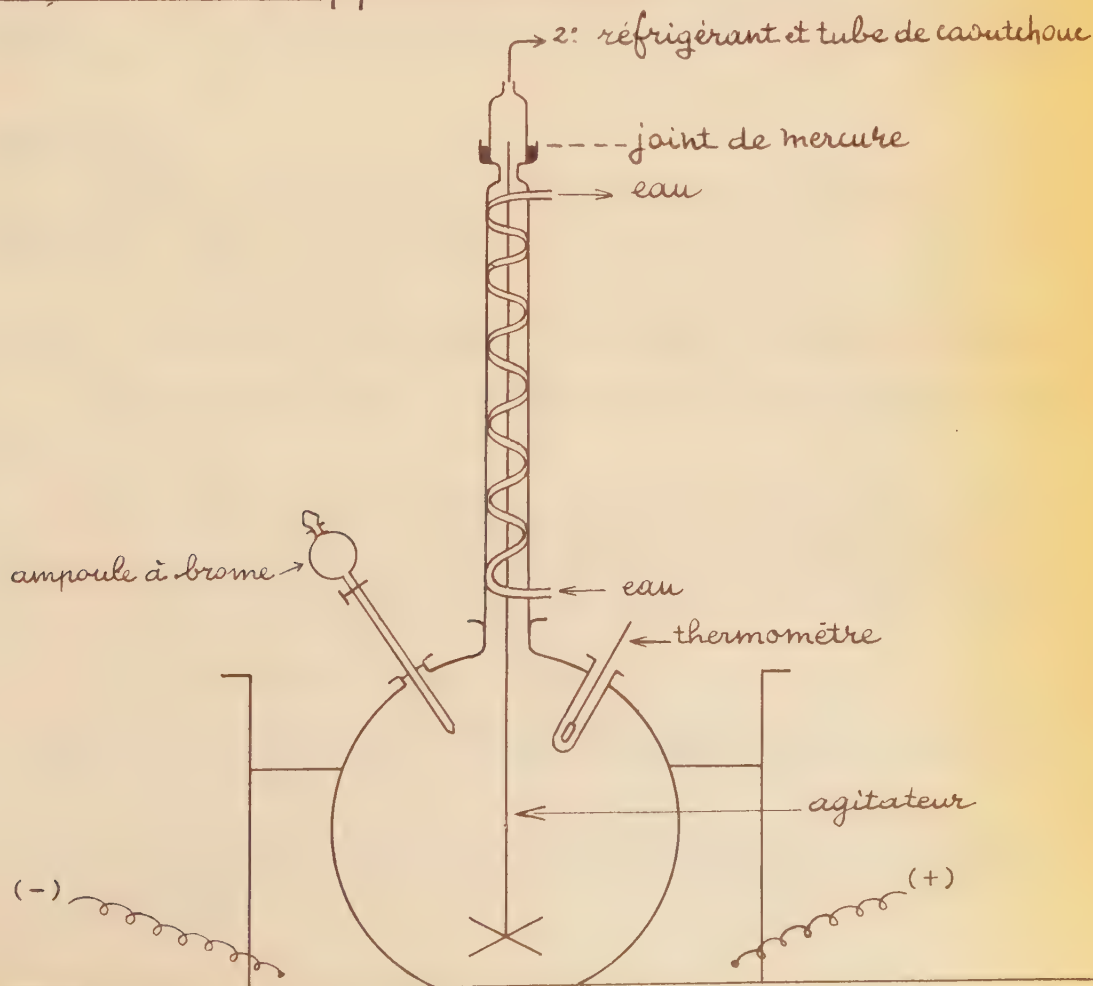


Schéma de l'appareil utilisé



l'éther, jusqu'à ce que la solution aqueuse devienne pratiquement incolore.

Les liqueurs étherées, séchées sur sulfate de sodium anhydre, sont distillées sous pression réduite; le résidu, constitué par l'oxalosuccinate d'éthyle, se présente sous forme d'une huile jaunâtre, dont nous avons obtenu 170 g.

- Préparation de l'acide α céto-glutarique

L'oxalosuccinate d'éthyle est alors additionné de 600 ml d'acide chlorhydrique concentré et on laisse au repos pendant 12 heures.

Le mélange est ensuite concentré par distillation sous une hotte à fort tirage, jusqu'à ce que la température du liquide atteigne 140°C; celui-ci est alors décanté, puis abandonné au refroidissement pour cristallisation.

La masse solide ainsi recueillie est pulvérisée, dissoute à chaud dans l'acétone, et la recristallisation obtenue par addition de benzène chaud jusqu'à légère opalescence; par refroidissement, l'acide α céto-glutarique cristallise.

Caractères

L'acide α céto-glutarique se présente sous forme de cristaux légèrement jaunes, très solubles dans l'eau et l'alcool, peu solubles dans l'éther.

La solution alcoolique additionnée d'une trace de chlorure ferrique, donne une coloration jaune verdâtre.

Le point de fusion instantanée au bloc Maquenne est de: 110° -111° C.

Nous venons de décrire les milieux de culture que nous avons utilisés pour la recherche des acides aminés libres élaborés par *B. roseus fluorescens*, ainsi que le mode de préparation d'acides cétoniques que nous n'avons pu nous procurer dans le commerce.

Nous envisagerons maintenant:

- 1) l'étude de la croissance de *B. roseus fluorescens* cultivé sur différents milieux synthétiques à base d'acides organiques
- 2) la recherche des acides aminés libres synthétisés par *B. roseus fluorescens* à partir de ces divers acides organiques.

I) ETUDE DE LA CROISSANCE de B. ROSEUS FLUORESCENS SUR
DIFFERENTS MILIEUX SYNTHETIQUES A BASE D'ACIDES
ORGANIQUE.

A) INFLUENCE DE CERTAINES SUBSTANCES HYDROCARBONEES SUR LA
CROISSANCE DE B. ROSEUS FLUORESCENS EN MILIEU PYRUVATE.

La mesure de la croissance de B. roseus fluorescens a été réalisée au moyen du biophotomètre enregistreur de BONET-MAURY.

Nous utilisons comme milieu de base, le milieu signalé précédemment (p.100), auquel nous avons incorporé 0,75% de pyruvate de sodium. Ce milieu présente un précipité, formé surtout de phosphates de calcium, de fer, et de magnésium, et nous ne l'utilisons qu'après en avoir éliminé le précipité. Dans certains cas, ce milieu est dilué avec de l'eau distillée, de façon à obtenir une concentration de 0,50% (pour une série d'expériences).

Des solutions aqueuses à 30% de glucose, mannose et de glycérine sont préparées et filtrées sur bougie L 3. Dans des expériences, que nous indiquons par ailleurs (chapitre IV), nous avons en effet remarqué que seules ces trois substances permettaient à B. roseus fluorescens d'élaborer son pigment rouge en milieu pyruvate.

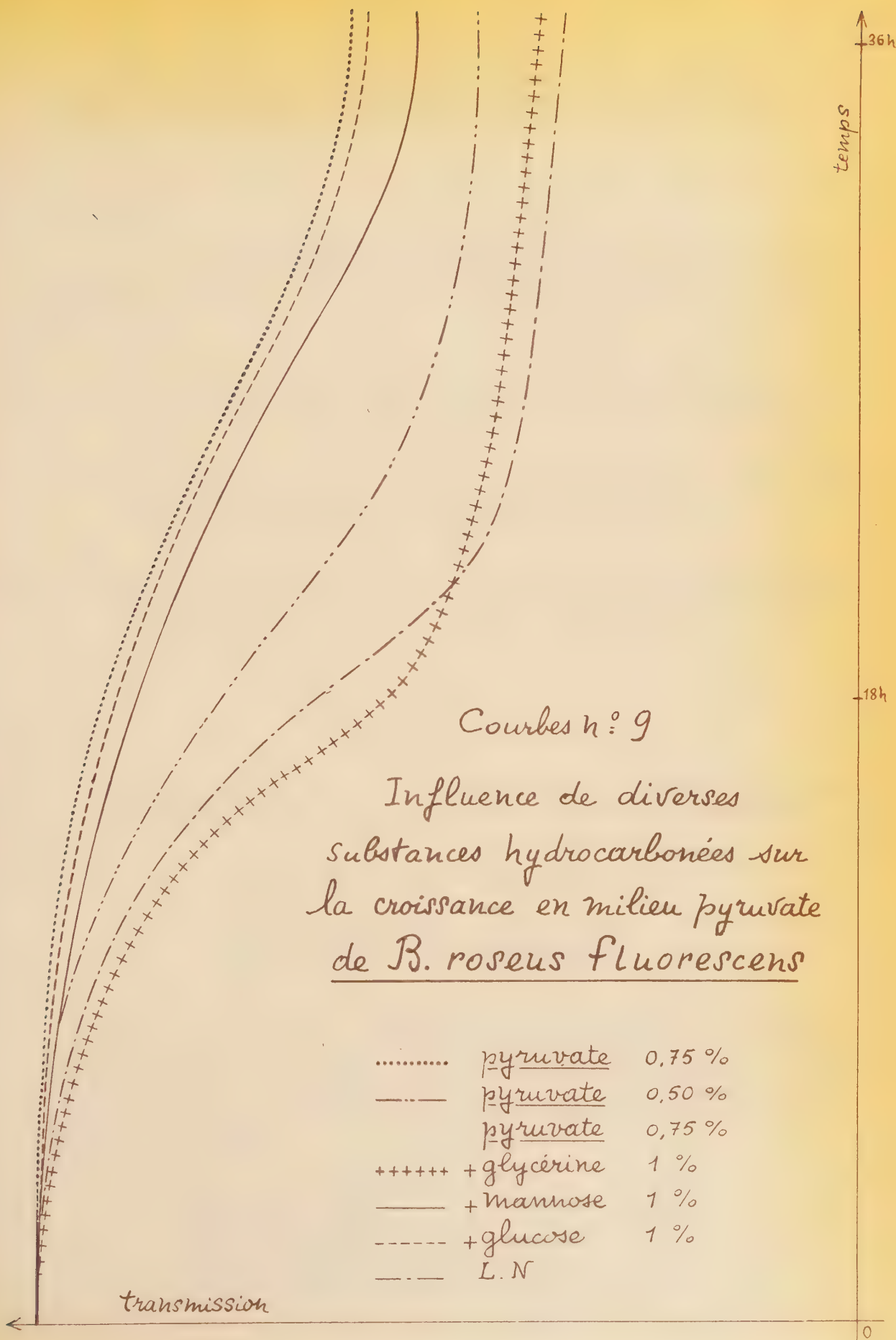
Chaque fiole du biophotomètre est composée de:

- 8 ml de milieu au pyruvate pur ou dilué; ou de 7,7 ml de milieu et 0,3 ml de solution de glucose, glycérine ou mannose (concentration finale en substance hydrocarbonée: 1%)
- 0,2 ml de suspension de germes dans l'eau distillée.

Les germes servant à l'ensemencement, proviennent d'une culture sur gélose de 17 heures, lavée deux fois à l'eau physiologique, puis mise en suspension dans l'eau distillée.

Nous réalisons les systèmes suivants:

pyruvate 0,75%
pyruvate 0,50%
pyruvate 0,75% + glycérine 1%
pyruvate 0,75% + glucose 1%
pyruvate 0,75% + mannose 1%
L_I (8 ml de milieu décanté servant de témoin)



La durée de nos expériences fut de 34 et 36 heures et nous avons effectué plusieurs séries d'essais afin de confirmer nos résultats.

RESULTATS

L'enregistrement de la croissance de *B. roseus fluorescens* au biophotomètre de Bonet-Maury nous a donné une série de courbes, dont nous donnons la reproduction (courbes n° 9).

Nous pouvons en tirer les conclusions suivantes:

- 1) Dans toutes nos expériences, les courbes témoins en milieu L_I donnèrent toujours des résultats comparables.
- 2) La croissance de *B. roseus fluorescens* est bien plus importante pour une concentration en pyruvate de 0,50% que pour une concentration de 0,75%
- 3) Lorsque la concentration en pyruvate est de 0,75%, nous pouvons classer la valeur des substances carbonées utilisées par *B. roseus fluorescens* dans l'ordre décroissant suivant:

- (1) glycérine
- (2) mannose
- (3) glucose

- 4) Ces expériences nous permettent de classer ainsi les milieux où la croissance de ce germe est maxima:

L_I
{ pyruvate 0,75% + glycérine 1%
 pyruvate 0,50%
 pyruvate 0,75% + mannose 1%
 pyruvate 0,75% + glucose 1%
 pyruvate 0,75%

Dès la fin de nos expériences, nous mesurons immédiatement les pH de chaque milieu: toute utilisation du substrat se traduit par une variation du pH du milieu, d'autant plus forte que le métabolisme est plus intense. Les pH de départ sont uniformément de 6,35 et nous obtenons les résultats suivants:

L_I	8,3
pyruvate 0,50%	8,25
pyruvate 0,75%	7,65
pyruvate 0,75% + glycérine 1%	7,5
pyruvate 0,75% + glucose 1%	7,1
pyruvate 0,75% + mannose 1%	7,1

Si les variations des pH des milieux contenant 0,50% et 0,75% de pyruvate, et du milieu LI sont en rapport avec les variations du taux de croissance de *B. roseus fluorescens* sur ces mêmes milieux, il n'en est plus de même si l'on ajoute au pyruvate, du glucose, du mannose ou de la glycérine. Ces différences sont dues au fait que *B.roseus fluorescens* utilise ces trois substances et les dégrade avec formation d'acides.

B) INFLUENCE DE QUELQUES ACIDES ORGANIQUES SUR LA CROIS-
SANCE DE B. ROSEUS FLUORESCENS

Dans chaque cuve du biophotomètre de Bonet-Maury, nous répartissons successivement:

- 7,5 ml de milieu de base privé de son précipité
- 0,5 ml de solution d'acide organique
- 0,2 ml de suspension microbienne.

Les solutions d'acides organiques sont ainsi préparées:

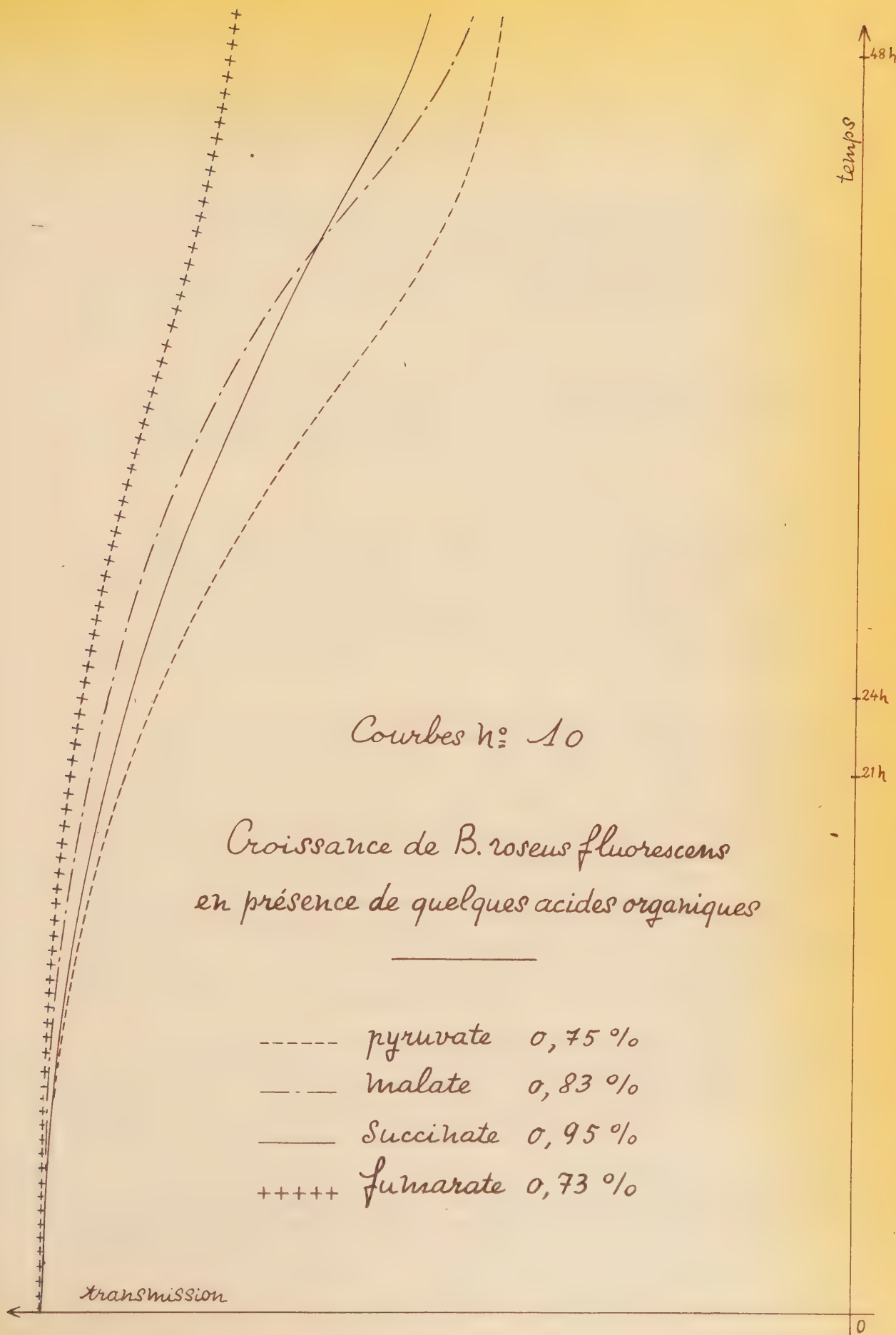
			concentration	finale:
pyruvate de sodium	0,5 ml,	d'une solution à 12%		0,75%
acide α céto glutarique	0,5 ml,	"	11,2%	0,70%
succinate d'ammonium	0,5 ml,	"	15,2%	0,95%
acide malique	0,5 ml,	"	13,2%	0,83%
acide fumarique	0,5 ml,	"	11,6%	0,73%

Les concentrations de ces solutions ont été calculées de façon à introduire dans chaque milieu la même quantité de carbone, que celle apportée par le pyruvate (soit 0,25% de carbone). Les solutions d'acides sont neutralisées par la quantité théorique de bicarbonate de sodium.

Les germes sont fournis par une culture de *B.roseus fluorescens* sur gélose, âgée de 17 heures, et lavés à l'eau physiologique. Le dernier culot de centrifugation est remis en suspension homogène dans de l'eau distillée. Cette suspension microbienne sert ensuite à ensemercer chaque cuve.

Nous avons réalisé plusieurs séries d'expériences, qui ont toutes duré 48 heures et nous donnons une reproduction des courbes d'enregistrement de la croissance, obtenues au biophotomètre (courbes n° 10).

D'après ces courbes, nous avons pu classer, par ordre décroissant, les différents milieux selon leur valeur nutritive:



- pyruvate 0,75%
- malate 0,83% et succinate 0,95%
- α cétooglutarate 0,70%
- fumarate 0,73%

Il semblerait que l'introduction de carbones supplémentaires ou de toute fonction tendant à compliquer la molécule (fonction alcool ou double liaison), diminue pour *B. roseus fluorescens* la valeur nutritive du composé.

2) RECHERCHE DES ACIDES AMINES LIBRES ELABORES PAR *B. ROSEUS FLUORESCENS* SUR DIVERS MILIEUX SYNTHETIQUES A BASE D'ACIDES ORGANIQUES

Après 3, 6, 10 et 15 jours de culture à 25°C de *B. roseus fluorescens* sur les milieux synthétiques précédemment indiqués (p.100), le contenu des tubes est centrifugé pour en séparer les corps microbiens.

Les acides aminés libres, élaborés par ce germe, sont extraits des cultures selon la méthode de MACHE-BOEUF (84).

Au liquide obtenu après centrifugation de la culture microbienne, nous ajoutons un égal volume d'alcool à 95°, afin de précipiter les composés protéiniques du milieu. Après une nouvelle centrifugation, le liquide clair décanté, est soumis à une évaporation sous vide, afin d'en éliminer l'alcool et la majeure partie de l'eau. Le résidu est repris par un peu d'eau et délipidé par agitation avec de l'éther sulfurique. La solution ainsi débarrassée des lipides, est alors évaporée sous vide à siccité; le résidu, repris par quelques gouttes d'eau distillée, contient tous les acides aminés de la culture, dans une liqueur débarrassée des ions pouvant gêner ultérieurement la chromatographie et l'électrophorèse.

La séparation et l'identification des acides aminés de ces solutions fut effectuée en appliquant la chromatographie et l'électrophorèse sur papier Schleicher et Schull n° 2.403 A, selon les techniques générales précédemment indiquées (I^o partie - Chapitre II).

Nos résultats ont été obtenus en montant de multiples chromatogrammes dans des solvants divers, selon deux procédés différents, et en effectuant de nombreuses électrophorèses.

C'est ainsi que nous avons réalisé:

a) la chromatographie ascendante:

- en butanol acétique durant 18 à 40 heures.
- en phénol ammoniacal durant 16 heures.

b) la chromatographie en arc de cercle:

selon la méthode modifiée par J.G. MARCHAL et R. BENE (143) en butanol acétique durant 18 heures.

c) l'électrophorèse:

sous haute tension en solution tampon-véronal de pH=8,6 durant 5 heures.

La confrontation de très nombreux chromatogrammes et électrogrammes nous a permis d'identifier les divers acides aminés synthétisés par *B. roseus fluorescens* à partir d'acides organiques divers, chaque amino-acide donnant des spots différents selon la méthode employée. En variant les techniques, nous pouvons donc suivre les variations des spots et établir ainsi plus sûrement leur existence en éliminant au maximum les causes d'erreur dues aux artefacts.

Nous avons groupé nos résultats dans les tableaux n° VI.

Caractères de la tache Z, acide aminé retrouvé dans les cultures de *B. roseus fluorescens* en milieu à base d' α céto-glutarate:

- électrophorèse: spot neutre

- chromatographie (butanol acétique: spot supérieur à celui de l'alanine)
(phénol ammoniacal: spot dans la région de celui de la valine et de la méthionine: $0,77 < R_f < 0,80$)

- TABLEAU N° VI -

milieu de base, auquel nous avons ajouté, dans les proportions indiquées: (p.100)	temps de culture	acides aminés libres, élaborés par B.roseus fl. et caractérisés dans les milieux de culture.
<u>PYRUVATE</u> Valeurs minima et maxima du pH en un mois de culture: 6,8 7,8	3 jours	- alanine - acide glutamique
	6 jours	- alanine - acide glutamique
	10 jours	- alanine - acide glutamique - sérine (traces)
	15 jours	- alanine - acide glutamique - sérine
<u>PYRUVATE + GLYCERINE 1%</u> Valeurs minima et maxima du pH en un mois de culture: 6,4 6,9	3 jours	- alanine - acide glutamique
	6 jours	- alanine - acide glutamique - arginine (traces)
	10 jours	- alanine - acide glutamique - arginine
	15 jours	- alanine - acide glutamique - arginine

- TABLEAU N° VI (suite 1) -

milieu de base, auquel nous avons ajouté, dans les pro- portions indiquées (p.100):	temps de culture	acides aminés libres, élaborés par B.ros.fl. et caractérisés dans les milieux de culture
<u>PYRUVATE + GLUCOSE 1%</u> Valeurs minima et maxima du pH en un mois de culture: 6,2 6,5	3 jours	- alanine (traces) - acide glutamique - cystéine
	6 jours	- alanine (traces) - acide glutamique - cystéine
	10 jours	- alanine - acide glutamique - cystéine - arginine
	15 jours	- alanine - acide glutamique - cystéine - arginine
<u>PYRUVATE + MANNOSE 1%</u> Valeurs minima et maxima du pH en un mois de culture: 6,5 6,7	3 jours	- alanine - acide glutamique - cystéine
	6 jours	- alanine - acide glutamique - cystéine
	10 jours	- alanine - acide glutamique - cystéine
	15 jours	- alanine - acide glutamique - cystéine

- TABLEAU N° VI (suite II) -

milieu de base, auquel nous avons ajouté, dans les proportions indiquées: (p.100)	temps de culture	acides aminés libres, élaborés par B. ros.fl. et caractérisés dans les milieux de culture
ACETATE ===== Valeurs minima et maxima du pH en un mois de culture: 6,4 6,1	3 jours	- acide glutamique
	6 jours	- acide glutamique
	10 jours	- acide glutamique
	15 jours	- acide glutamique
OXALOACETATE ===== Valeurs minima et maxima du pH en un mois de culture: 6,2 8,55	L'incorporation au milieu d'oxaloacétate à la place de pyruvate, n'amène aucun changement. Malgré les précautions prises, il semblerait que cet acide se décompose selon ce schéma: $ \begin{array}{ccc} \text{CO-COOH} & & \text{CH}_3\text{-CO-COOH} + \text{CO}_2 \\ & & \uparrow \\ \text{CH}_2\text{-COOH} & \longrightarrow & \text{acide pyruvique} \\ \text{acide oxaloacétique} & & \end{array} $ On est de toute façon ramené au cas du pyruvate, soit que le pyruvate fixe l'anhydride carbonique de l'air pour donner l'oxaloacétate, soit que l'acide oxaloacétique se décompose en acide pyruvique.	

- TABLEAU N° VI (suite III) -

milieu de base, auquel nous avons ajouté, dans les pro- portions indiquées (p.100)	Temps de culture	acides aminés libres, élaborés par B.ros.fl.et caractérisés dans les milieux de culture
<u>CITRATE</u> ===== Valeurs minima et maxima du pH en un mois de culture: 6,4 8,7	3 jours	- alanine) faibles - acide glutamique) quantités
	6 jours	- alanine - acide glutamique
	10 jours	- alanine - acide glutamique
	15 jours	- alanine - acide glutamique
<u>MALATE</u> ===== Valeurs minima et maxima du pH en un mois de culture: 6,2 8,4 <u>FUMARATE</u> ===== Valeurs minima et maxima du pH en un mois de culture: 6,4 8,4	3 jours	- acide aspartique (traces)
	6 jours	- acide aspartique
	10 jours	- acide aspartique - alanine (traces)
	15 jours	- acide aspartique - alanine (traces)
	3 jours	- acide aspartique
	6 jours	- acide aspartique
	10 jours	- alanine - acide aspartique - cystéine (traces)
	15 jours	- alanine - acide aspartique
	3 jours	- acide aspartique
	6 jours	- acide aspartique

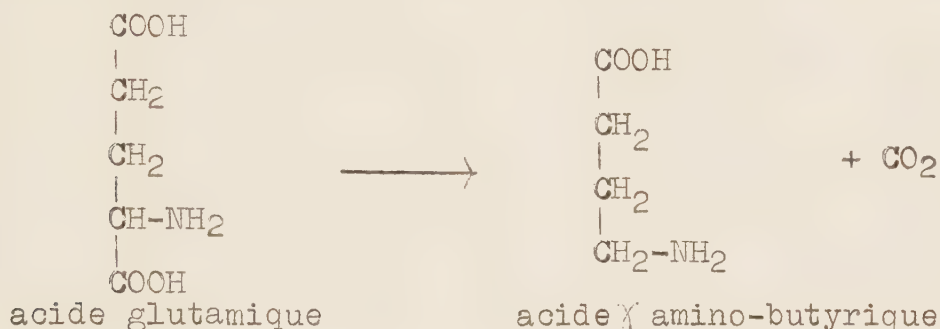
- TABLEAU N° VI - (fin)

milieu de base, auquel nous avons ajouté dans les pro- portions indiquées (p.100):	Temps de culture	acides aminés libres, élaborés par B. ros. fl. et caractérisés dans les milieux de culture
<u>SUCCINATE</u> Valeurs minima et maxima du pH en un mois de culture: 6,1 8,3	3 jours	- acide glutamique (traces) - cystéine
	6 jours	- acide glutamique - cystéine
	10 jours	- alanine - acide glutamique - cystéine
	15 jours	- alanine - acide glutamique - cystéine - tache "X"
<u>✕ CETOGLUTARATE</u> Valeurs minima et maxima du pH en un mois de culture: 6 8	3 jours	- acide glutamique
	6 jours	- acide glutamique
	10 jours	- acide glutamique - tache "Z"
	15 jours	- acide glutamique - tache "Z"

Il ne peut s'agir ni de lysine, ni d'arginine car, en ce cas, nous aurions à l'électrophorèse un spot migrant vers le pôle négatif. Il s'agit, en fait, d'un amino-acide ne migrant pas sous l'effet du courant dans une solution tampon de pH=8,6 et dont le Rf en phénol ammoniacal est assez élevé.

Nous avons pu ainsi identifier la tache "Z" avec celle de l'acide γ amino-butyrique.

Cet acide est en effet un produit normal de la dégradation ultérieure de l'acide glutamique:



Les caractères de la tache "X" observée avec le milieu au succinate, nous font penser à la même substance.

Malheureusement, nous n'avons pas pu en faire l'identification en phénol-ammoniacal. La chromatographie n'a pas pu être réalisée convenablement avec ce solvant: il faut trop charger les gouttes de départ, ce qui donne des effets de "queues" trop importants pour pouvoir localiser exactement les spots.

REMARQUES

L'étude des acides aminés synthétisés par *B.roseus fluorescens* en milieu à l'acétate et au citrate, ne nous a pas donné les résultats escomptés.

B.roseus fluorescens pousse très mal dans un milieu où la seule source de carbone est fournie par l'acétate. Nous avons dû réaliser un ensemencement très dense du milieu de culture à l'acétate, pour avoir quelques résultats. Bien que ne donnant pas un développement apparent, ce germe survit dans ce milieu de culture; en effet, après un mois de séjour à l'étuve à 25°C, *B.roseus fluorescens* est capable de se multiplier de nouveau normalement en eau peptonée, et de produire son pigment rouge en milieux L₁ et L₂. Il a de plus conservé tous ses caractères morphologiques et biochimiques habituels.

La chromatographie et l'électrophorèse des extraits de ses cultures en milieu acétate, nous ont donné des résultats difficiles à interpréter, du fait de leur teneur extrêmement faible en amino-acides.

La chromatographie et l'électrophorèse des extraits de culture de *B. roseus fluorescens* en milieu citraté, furent également très difficiles. Bien que la croissance de ce germe puisse s'effectuer dans ce milieu, la quantité d' amino-acides élaborés reste très faible, rendant ainsi délicates ces méthodes d'investigation. Si les chromatogrammes sont réalisés sans trop charger les gouttes de départ, il est impossible d'obtenir des spots visibles des acides aminés, après révélation à la ninhydrine. Si, au contraire, nous les effectuons en chargeant les gouttes de départ, leur lecture devient alors sinon impossible, du moins très délicate du fait de l'existence de "queues" et de traînées, que nous n'avons jamais pu réduire complètement et que nous avons déjà rencontrées lors de l'étude des caractères chromatographiques de la tache "X" (observée en milieu succinate).

INTERPRETATION DES RESULTATS

Nous donnons tout d'abord un tableau schématique du cycle de KREBS (p.II3), montrant la filiation des acides di- et tricarboxyliques et leur relation avec les acides aspartique et glutamique.

Prenons le cas des expériences où le pyruvate est la seule source de carbone.

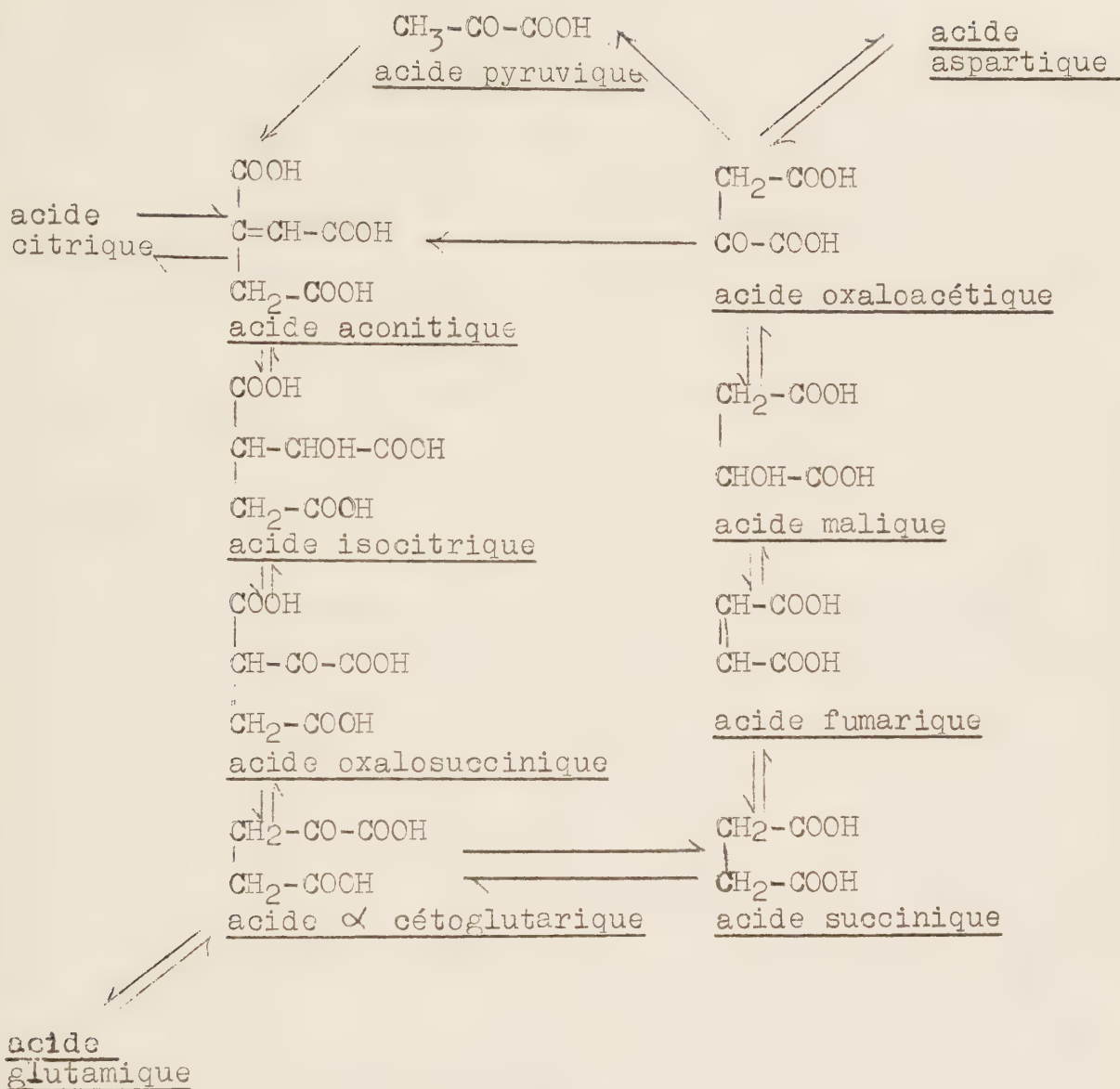
Nous trouvons les acides aminés suivants:

alanine
acide glutamique
sérine (à partir du 10^e jour)

Dès 1925, l'hypothèse d'une fixation de l'ion ammonium sur les acides cétoniques avait été émise par KNOOP et OSTERLIN (200).

Les travaux de Von EULER et de ses collaborateurs (201) et de DEWAN (202), montrèrent la formation d'acide glutamique à partir d'acide α-cétoglutarique et d'ammoniac.

Actuellement, la fixation des ions ammonium sur les céto-acides, est un mode de formation des acides aminés reconnu par tous les auteurs.



Nous pouvons donc admettre:

- 1°-L'existence d'un phénomène d'amination réductrice
qui transforme l'acide pyruvique en alanine
- 2°-une fixation d'anhydride carbonique sur le pyruvate
selon la réaction de WOOD et WERKMANN, aboutissant
à la formation d'oxaloacétate.
- 3°-une amination réductrice de l'oxaloacétate,
qui donne lieu à la formation d'acide aspartique

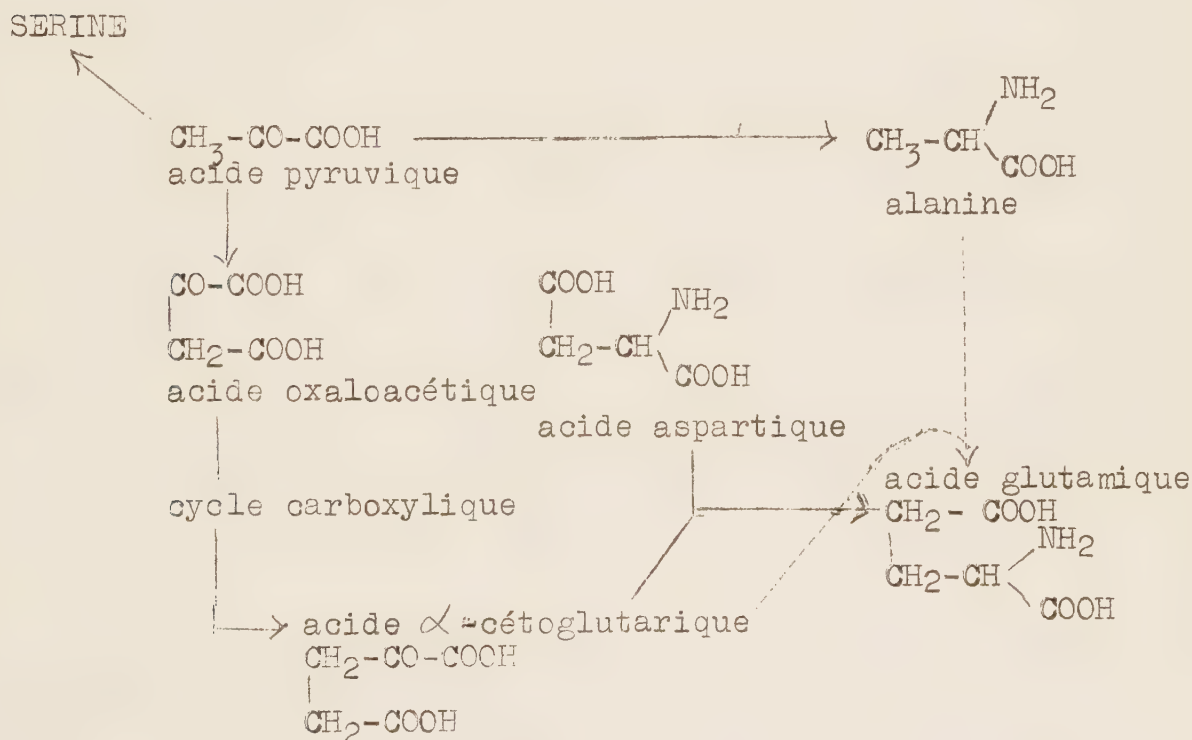
4°- la formation d'acide α cétooglutarique

5°- la formation d'acide glutamique

- soit par amination réductrice de l' α cétooglutarate,
- soit par transamination avec l'alanine préformée (des expériences faites antérieurement - p. 94 - nous ont montré l'existence de réactions de transamination chez *B. roseus fluorescens*)

6°- la sérine qui se forme à partir du 10° jour, prendrait naissance directement à partir du pyruvate du milieu.

On pourrait représenter ces transformations par le schéma suivant:



COMMENT SE FAIT-IL QUE NOUS NE RETROUVIONS PAS D'ACIDE ASPARTIQUE?

- Il n'y a pas lieu de supposer que l'amination réductrice de l'oxaloacétate ne se fasse pas, puisque nous l'avons admise pour le pyruvate.
- Nous devons également noter que, s'il se forme de l'acide aspartique, celui-ci n'est pas stocké sous forme de

son amide, l'asparagine.

QUELLES SERAIENT ALORS LES HYPOTHESES?

- 1) une transamination totale entre l'aspartate et l' α céto-glutarate aboutissant à la formation de glutamate:

aspartate + α céto-glutarate $\longrightarrow$ glutamate + oxaloacétate

L'oxaloacétate serait ensuite dégradé en pyruvate (formation ultérieure d'alanine).

- 2) l'aspartate pourrait rejoindre le cycle de l'urée par l'intermédiaire de la citrulline.

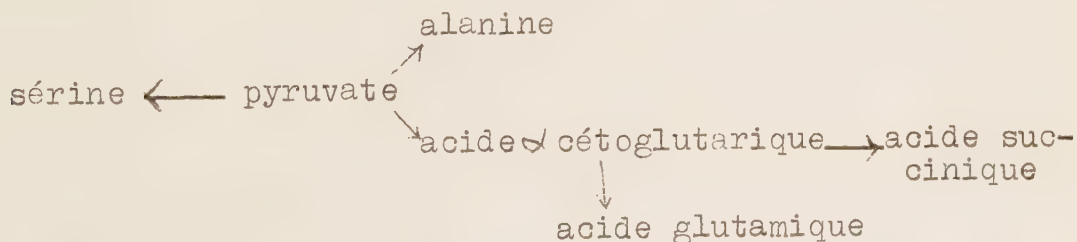
Ceci pourrait peut-être expliquer la présence d'arginine dans les milieux au pyruvate contenant de la glycérine ou du glucose.

- 3) Nous aurions pu penser que l'aspartate se transformerait en malate et, par là même, pourrait rejoindre le cycle de KREBS. En fait, les études ultérieures faites sur le malate p.145 (l'acide aminé formé étant l'aspartate), ne semblent pas prévaloir en faveur de cette hypothèse.

- 4) Il n'y aurait pas fixation d'anhydride carbonique sur le pyruvate, donc pas de formation d'oxaloacétate, ni par là même, d'aspartate.

- 5) Enfin, nous avons établi dans des expériences antérieures, que *B. roseus fluorescens* désaminait l'acide aspartique très rapidement et complètement (p 85). Nous pourrions donc penser que l'aspartate est totalement assimilé par ce germe, ce qui expliquerait son absence.

Nos études ultérieures sur les acides organiques ne permirent pas de mettre en évidence la présence d'acide citrique, dans un milieu à base de pyruvate. Par contre, nous avons décelé la formation d'acide α céto-glutarique. Nous proposons donc le schéma suivant:



Quant à la formation de cystéine dans certains milieux (pyruvate + glucose ou mannose, succinate), nous pourrions envisager le passage de la sérine à la cystéine par transsulfuration, le soufre étant fourni par le sulfate du milieu ou par la méthionine contenue dans le corps bactérien.

- Enfin, le milieu contenant de l'acide γ céto-glutarique, ne révèle que de l'acide glutamique, dont cet acide cétonique est le générateur. La tache "Z", identifiée à l'acide γ aminobutyrique, proviendrait de la décarboxylation de l'acide-amine par *B. roseus fluorescens*.

Lorsque nous comparons tous nos résultats, un fait nous frappe particulièrement: l'acide glutamique et l'alanine sont les acides aminés les plus fréquemment rencontrés, tandis que l'acide aspartique ne se rencontre que dans les milieux contenant du malate ou du fumarate.

Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par ABELSON (198) sur *Esch. coli* au moyen de substances marquées.

Cet auteur pensait que, dans ce cas, les faits étaient en accord avec l'existence possible du cycle tricarboxylique.

En ce qui nous concerne, nous ne pouvons encore rien conclure avant l'étude sur les acides organiques libres trouvés dans les milieux de culture de *B. roseus fluorescens*.

CONCLUSION

- 1° *B. roseus fluorescens* est capable de synthétiser plusieurs acides aminés aux dépens d'ammoniac et d'acides organiques divers.
- 2° Le glutamate et l'alanine se retrouvent toujours lorsque le milieu contient du pyruvate, du citrate, de l'acétate, du succinate, de l' α céto-glutarate, tandis que nous ne pouvons déceler l'aspartate que lorsque le substrat apporte du fumarate ou du malate.

Pyruvate, citrate, acétate, succinate et α céto-glutarate seraient donc d'égale valeur pour la synthèse de ces acides aminés et pourraient être remplacés l'un par l'autre, tandis que le fumarate et le malate formeraient un groupe à part.

- CHAPITRE III -
=====

ETUDE DU METABOLISME DE QUELQUES ACIDES ORGANIQUES
(acides di- et tricarboxyliques, acides cétoniques)
CHEZ B. ROSEUS FLUORESCENS.

Après avoir étudié les amino-acides libres existant dans les cultures de B. roseus fluorescens sur des milieux ayant pour seule source de carbone, divers acides organiques, il nous a semblé intéressant d'essayer de pénétrer le métabolisme de ces acides.

Nous avons donc recherché, après quelques études sur la croissance et la respiration, la présence possible de ces composés organiques dans les filtrats de culture de ce germe.

Nous envisagerons successivement:

- 1) l'influence de quelques acides organiques sur la croissance de B. roseus fluorescens.
- 2) l'étude de la respiration et du métabolisme oxydatif de ce germe en présence de ces composés.
- 3) la recherche des acides organiques existant à l'état libre, dans les cultures de B. roseus fluorescens.

I°.- INFLUENCE DE CERTAINS ACIDES ORGANIQUES SUR LA
CROISSANCE DE B. ROSEUS FLUORESCENS
=====

Nous avons recherché si B. roseus fluorescens pouvait utiliser pour sa croissance certains acides organiques intermédiaires du cycle de KREBS (acétate, pyru-

vate, citrate, ~~α~~ cétoglutarate, succinate, malate, fumarate), chaque substance testée étant la seule source de carbone du milieu. Nous avons fait cette étude en deux étapes:

- 1) Etude de la croissance en présence d'un seul acide organique
- 2) Etude de la croissance en présence de deux acides organiques
 - a) influence du pyruvate sur la croissance en divers milieux organiques (citrate, succinate, malate)
 - b) influence de l'acétate sur la croissance en divers milieux organiques (citrate, succinate)

Pour toutes ces expériences, nous utilisons le milieu suivant, ajusté à pH= 6,2/6,4, dont nous séparons le précipité pour obtenir une solution limpide:

acide organique	2 g
chlorure d'ammonium	0,72 g
phosphate dipotassique	0,25 g
sulfate de magnésium	0,50 g
chlorure de calcium	0,04 g
sulfate ferreux	0,01 g
eau bidistillée	100 ml

L'étude de la croissance est réalisée au moyen du biophotomètre enregistreur de BONET-MAURY.

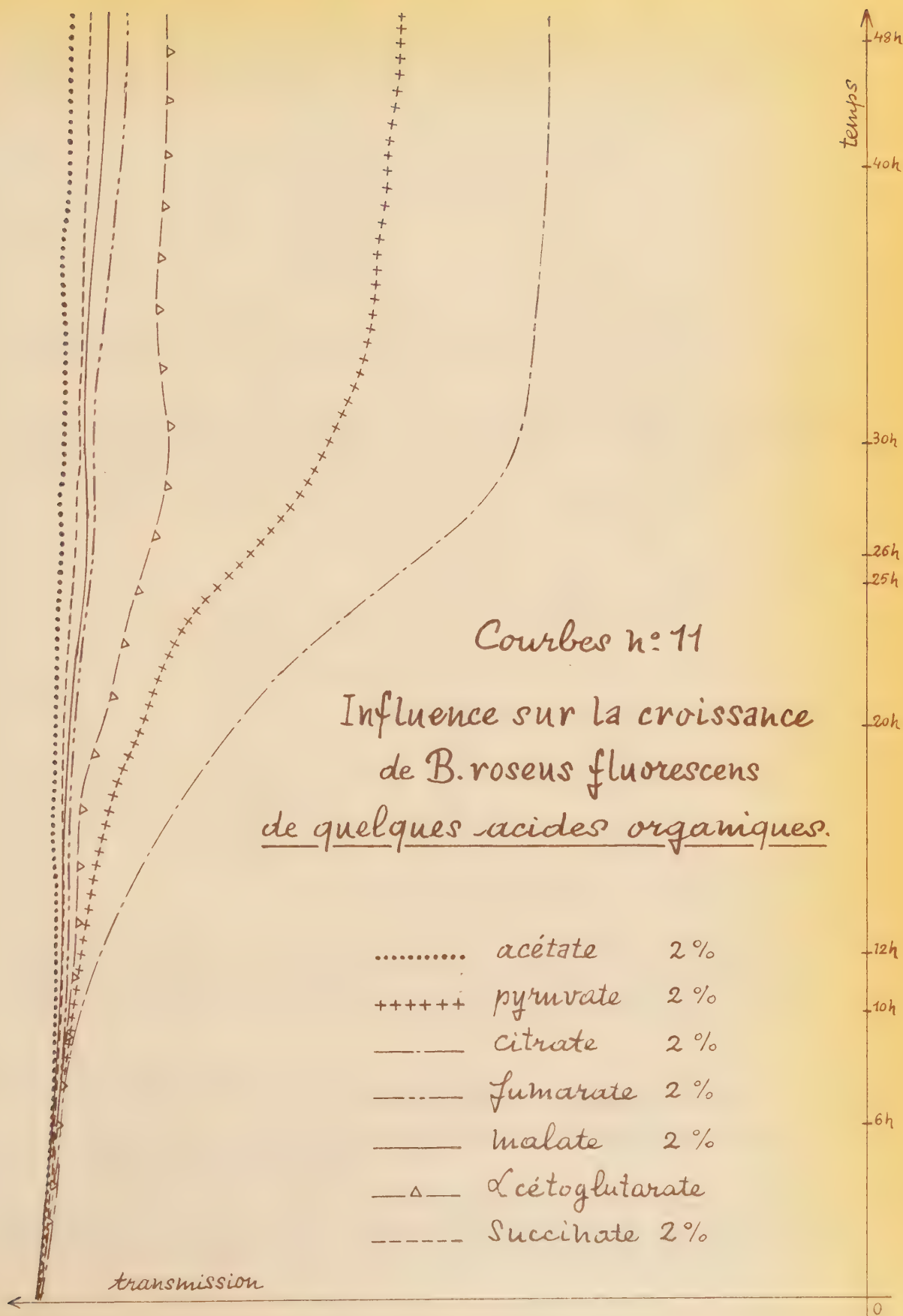
Nous réalisons une suspension faite en eau distillée, à partir d'une culture de *B. roseus fluorescens* sur gélose âgée de 17 heures. Les cellules sont d'abord lavées à l'eau physiologique, puis mises en suspension dans l'eau distillée, et servent à ensemercer les cuves du biophotomètre.

A) CROISSANCE EN PRESENCE D'UN SEUL ACIDE ORGANIQUE

Chaque cuve du biophotomètre contient:

- 8 ml de milieu de base additionné de 2% d'acide organique (sous forme de son sel de sodium)
- 0,2 ml de suspension bactérienne en eau distillée.

Nous laissons le biophotomètre fonctionner durant des temps variant de 48 à 54 heures.



La comparaison des courbes obtenues (courbes n°II), nous a permis de classer les différents acides organiques étudiés, selon leur influence sur la croissance de *B.roseus fluorescens*, dans l'ordre décroissant suivant:

citrate
pyruvate
 α cétooglutarate
fumarate
malate
succinate
acétate

Dès la fin de nos expériences, nous mesurons les pH des milieux nutritifs de chaque cuve.

En règle générale, nous pouvons admettre que la consommation des acides par *B. roseus fluorescens* entraîne une variation de pH, variation d'autant plus forte que le métabolisme est plus intense.

Nous avons trouvé les valeurs suivantes:

	pH initial	pH terminal
fumarate	6,25	9
α cétooglutarate	6,1	8,9
citrate	6,35	8,6
pyruvate	6,3	7,7
malate	6,3	6,5
succinate	6,35	6,4
acétate	6,4	6,25

Sauf pour l' α cétooglutarate et le fumarate, nous voyons que les variations de pH correspondent aux courbes de croissance obtenues et traduisent l'utilisation par *B. roseus fluorescens* des acides organiques.

B) CROISSANCE EN PRESENCE DE DEUX ACIDES ORGANIQUES

I- Influence du pyruvate sur la croissance en divers milieux organiques.

Le pyruvate, plaque tournante des principaux métabolismes, permet à *B. roseus fluorescens* de se développer facilement. Nous avons pensé que son incorporation dans

certain milieux organiques, pourrait modifier la croissance de ce germe. C'est pourquoi nous avons recherché l'influence de cet acide cétonique à des concentrations variées, sur la croissance de *B. roseus fluorescens* en milieux additionnés de citrate de sodium, de succinate d'ammonium ou de malate de sodium.

a) influence du pyruvate sur la croissance en milieu citrate

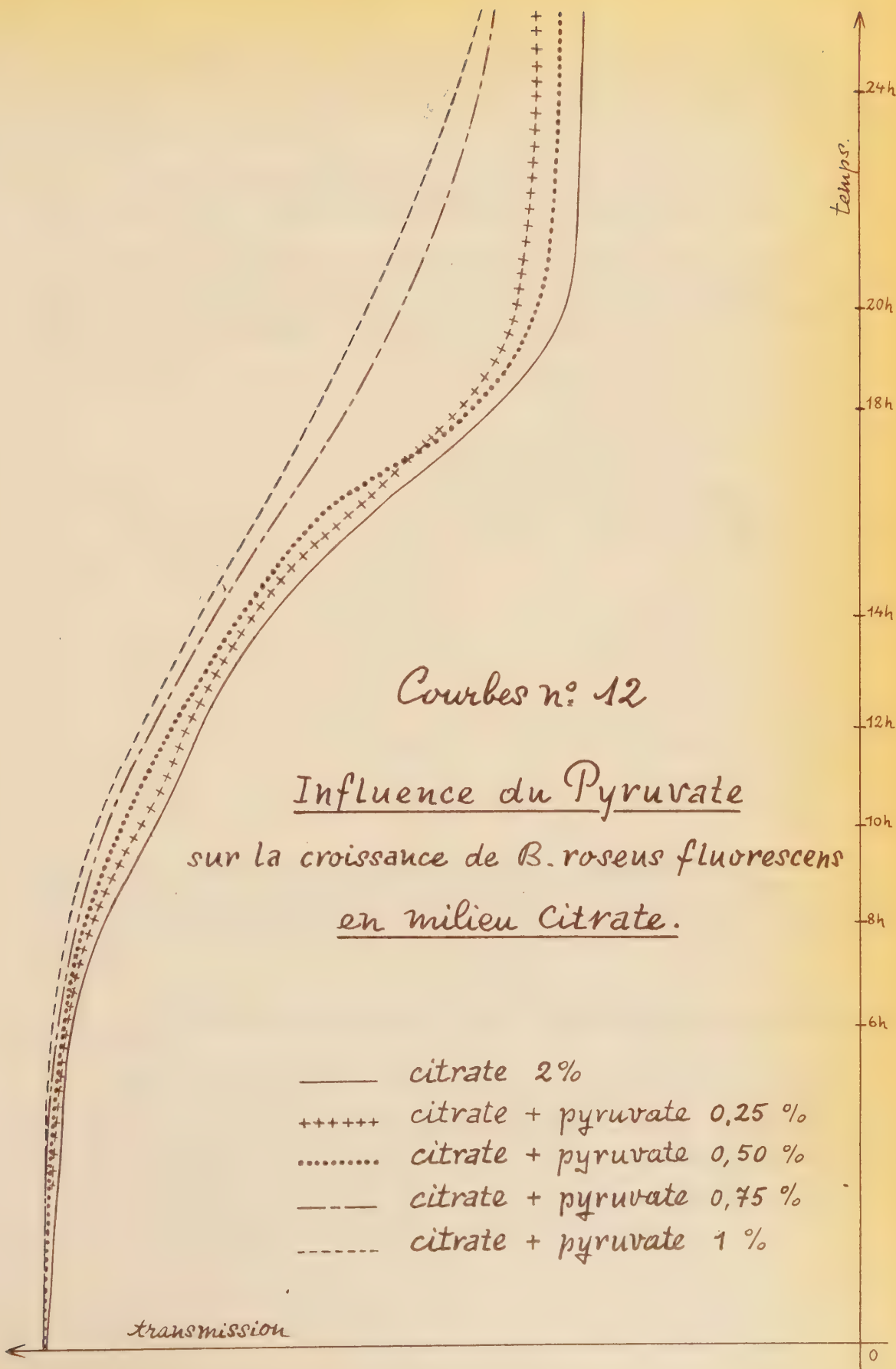
Nous réalisons le protocole suivant:

n° des cuves du biophoto- mètre	composition du liquide de culture			Concentra- tion en pyruvate
	milieu citra- té à 2% et décanté	sol.aqueu- se stérile de pyruvate à 20%	suspension microbien ne.	
1	8 ml	-	0,2 ml	0
2	7,9 ml	0,1 ml	"	0,25%
3	7,8 ml	0,2 ml	"	0,50%
4	7,7 ml	0,3 ml	"	0,75%
5	7,6 ml	0,4 ml	"	1 %
6	7,5 ml	0,5 ml	"	1,25%

Nous laissons le biophotomètre fonctionner 27 et 28 heures.

Nous avons obtenu une série de courbes (courbes n°12) dont nous indiquons dans le tableau suivant, quelques points relevés sur les originaux:

	intensité du courant électrique enregistrée en milliampères						
	6h	10h	12h	15h	18h	24h	28h
citrate	40	37	31	15	3	2	2
citrate + pyruvate 0,25%	40	35	27	11	2	1	1
citrate + pyruvate 0,50%	40	35	27	14	3	1	1
citrate + pyruvate 0,75%	40	37	33	25	17	5	1
citrate + pyruvate 1%	40	38	35	28	19	5	1



D'après ces courbes, nous voyons que le pyruvate n'a qu'un rôle peu accusé sur la croissance en milieu citraté à 2% (et ceci pour des concentrations de 0,25 et 0,50% en pyruvate).

A des concentrations supérieures, le pyruvate ne favorise pas la croissance en milieu citraté à 2%.

Dès la fin de nos expériences, nous avons mesuré le pH de chaque milieu de culture: l'utilisation du citrate provoque une élévation du pH d'autant plus marquée que le métabolisme est plus intense.

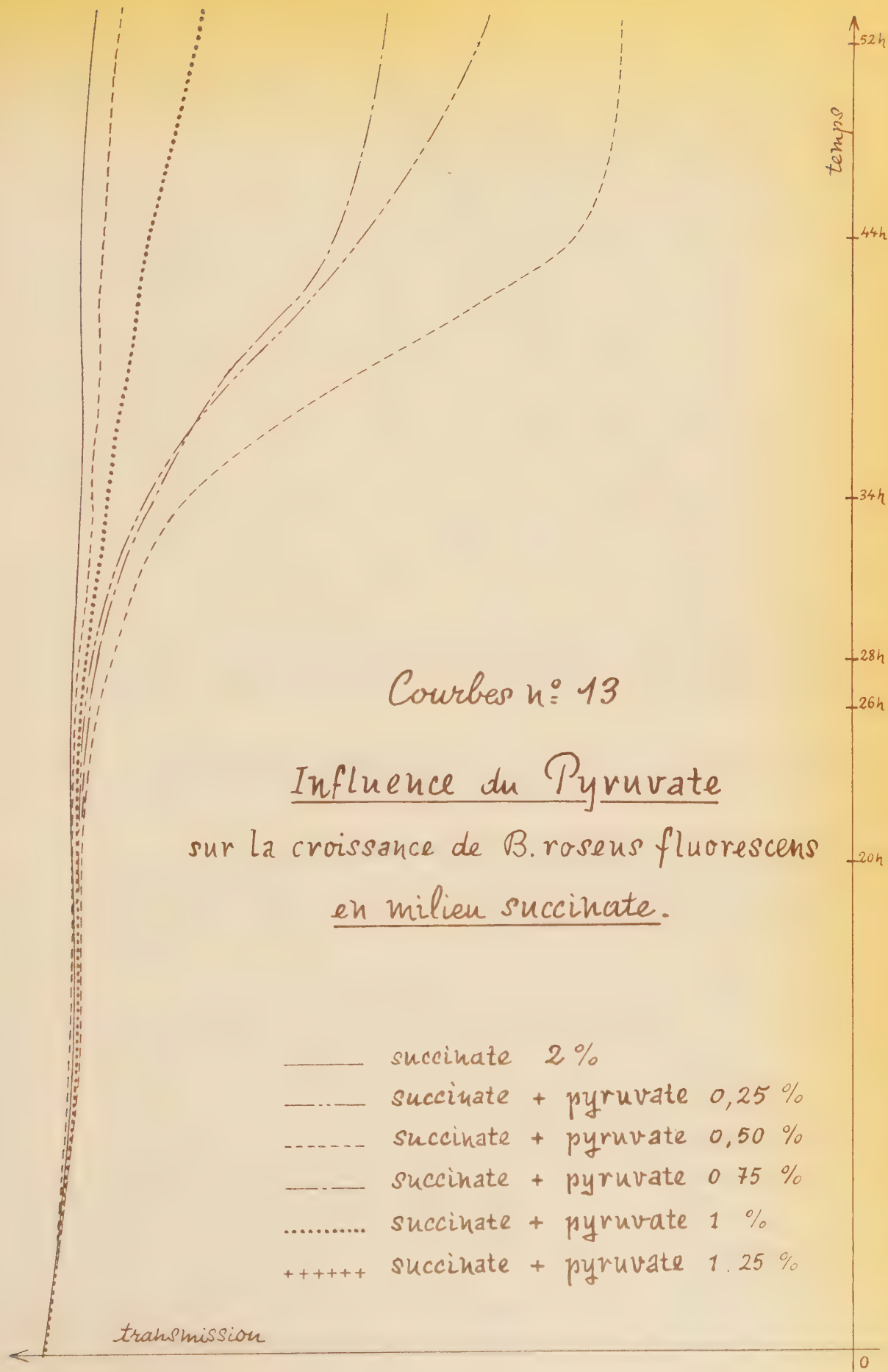
Nous obtenions les résultats suivants:

	pH initial	pH terminal
citrate	6,35	8,6
citrate + pyruvate, 0.25%	"	8,5
" " 0,50%	"	8,4
" " 0,75%	"	8,2
" " 1%	"	8
" " 1,25%	"	7,95

Les variations de pH traduisent nettement que le pyruvate ne favorise pas la croissance de *B. roseus fluorescens* en présence de citrate, en particulier pour des concentrations finales en pyruvate de 0,75%, 1%, 1,25%.

b) influence du pyruvate sur la croissance en milieu succinate

Nous réalisons le même protocole que pour l'étude en milieu citrate en utilisant comme base, un milieu au succinate (2%), privé de son précipité. Nous arrêtons le biophotomètre après 48 et 52 heures de fonctionnement. Nous obtenons une série de courbes (courbes n°13) dont nous indiquons, dans le tableau suivant, quelques points relevés directement sur les enregistrements:



	intensité du courant électrique enregistrée en milliampères				
	18h	30h	38h	42 h	48 h
succinate	40	40	39	39	37
succinate + pyruvate 0,25%	40	38	28	24	15
succinate + pyruvate 0,50%	40	34	20	1	1
succinate + pyruvate 0,75%	40	37	30	27	18
succinate + pyruvate 1%	40	37	36	35	34
succinate + pyruvate 1,25%	40	38	38	38	36

La lecture des courbes montre que l'addition de pyruvate à un milieu contenant 2% d'acide succinique a une influence favorable sur la croissance de *B. roseus fluorescens*.

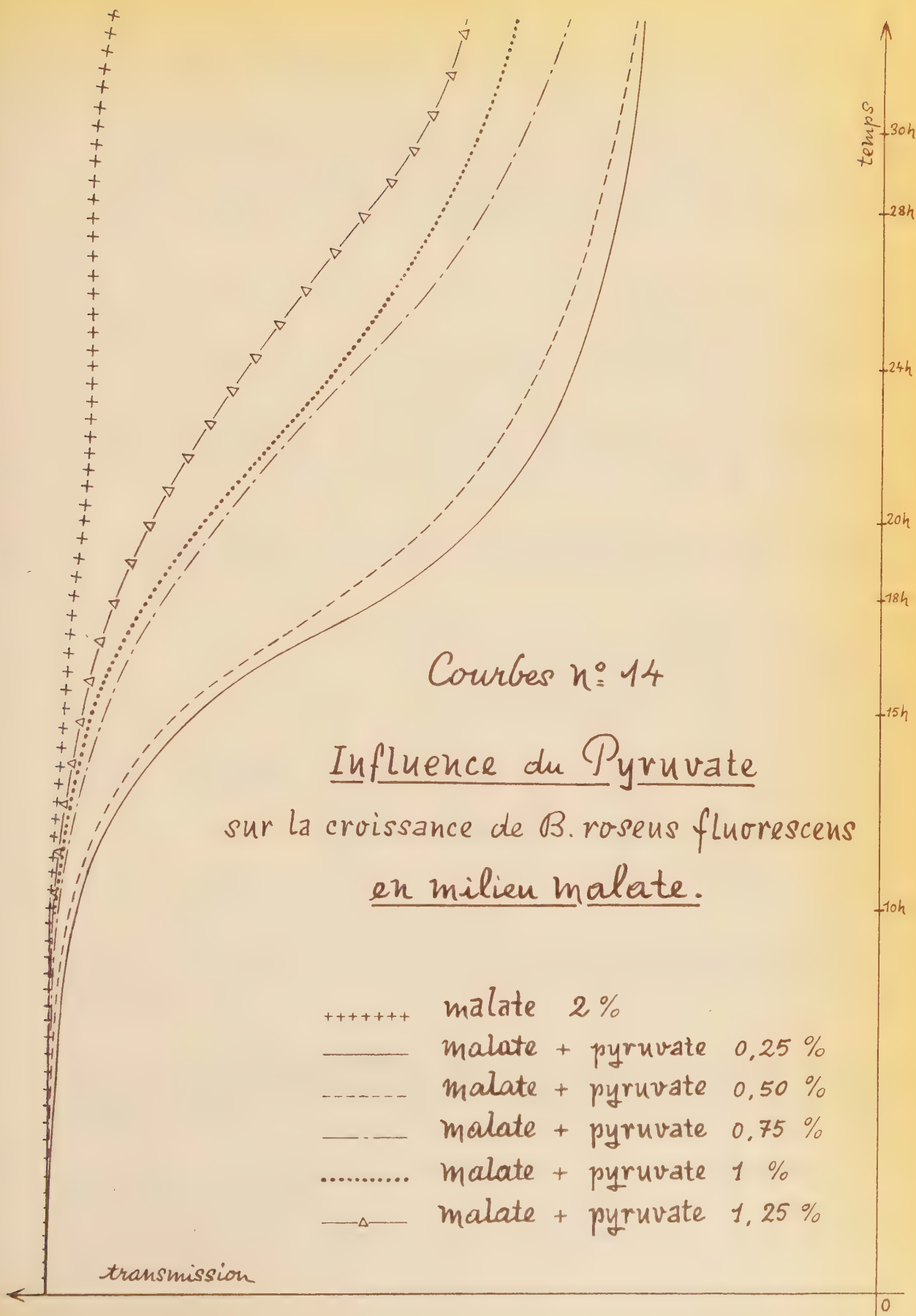
La concentration optima est de 0,50% de pyruvate. Avec une concentration de 0,25% ou de 0,75%, la croissance est à peu près identique.

Quant aux concentrations supérieures, si elles modifient très légèrement la courbe de croissance en comparaison de celle du succinate seul, elles ont une influence si relative que nous pouvons la considérer comme nulle.

A la fin de chacune de nos expériences, nous avons mesuré le pH de chaque liquide de culture.

Nous avons obtenu les résultats suivants:

			pH initial	pH terminal
succinate 2%			6,35	6,4
succinate 2% + pyruvate 0,25%			"	6,4
"	"	0,50%	"	6,75
"	"	0,75%	"	6,55
"	"	1%	"	6,4
"	"	1,25%	"	6,3



C'est avec une concentration en pyruvate de 0,50% que nous obtenons la valeur de pH la plus élevée.

Les autres valeurs de pH décroissent en fonction de l'utilisation des acides organiques par *B.roseus fluorescens* et ces résultats concordent bien avec ceux que nous avons obtenus en étudiant les variations de croissance de ce germe au biophotomètre.

c) influence du pyruvate sur la croissance en milieu malate

Nous opérons suivant un protocole identique aux précédents, en utilisant un milieu à base de malate.

Nous arrêtons le biophotomètre après 30 heures de fonctionnement, et nous relevons une série de courbes, dont nous donnons la reproduction (courbes n° 14).

Dans le tableau suivant, figurent quelques points relevés directement sur les courbes enregistrées par le biophotomètre.

			intensité du courant électrique enregistrée (en milliampères)					
			10h	15h	18h	20h	24h	30h
malate			30	29	27	26	24	22
malate + pyruvate	0,25%		30	26	21	16	6	1
"	"	0,50%	30	30	26	23	13	2
"	"	0,75%	30	30	28	25	15	3
"	"	1%	30	30	28	25	12	2
"	"	1,25%	30	30	30	28	21	3

D'après les courbes obtenues, nous voyons que l'addition de pyruvate à un milieu contenant 2% d'acide malique, a une influence favorable sur la croissance de *B. roseus fluorescens*.

Les concentrations optima en pyruvate sont de 0,25 et 0,50%. Avec l'augmentation de la concentration en pyruvate, le développement de ce germe diminue, mais reste supérieur à celui obtenu en milieu à base de malate seul.

Dès la fin de nos expériences, nous avons mesuré le pH de chaque milieu.

Nous obtenions les résultats suivants:

	pH initial	pH terminal
malate	6,4	6,5
malate + pyruvate 0,25%	"	7,2
" " 0,50%	"	7,3
" " 0,75%	"	7,2
" " 1%	"	7,1
" " 1,25%	"	7,1

Comme toute consommation des acides du substrat par *B. roseus fluorescens* se traduit par une élévation du pH, nous retrouvons là encore, le rôle favorable du pyruvate sur la croissance de ce germe en milieu additionné de malate à 2%.

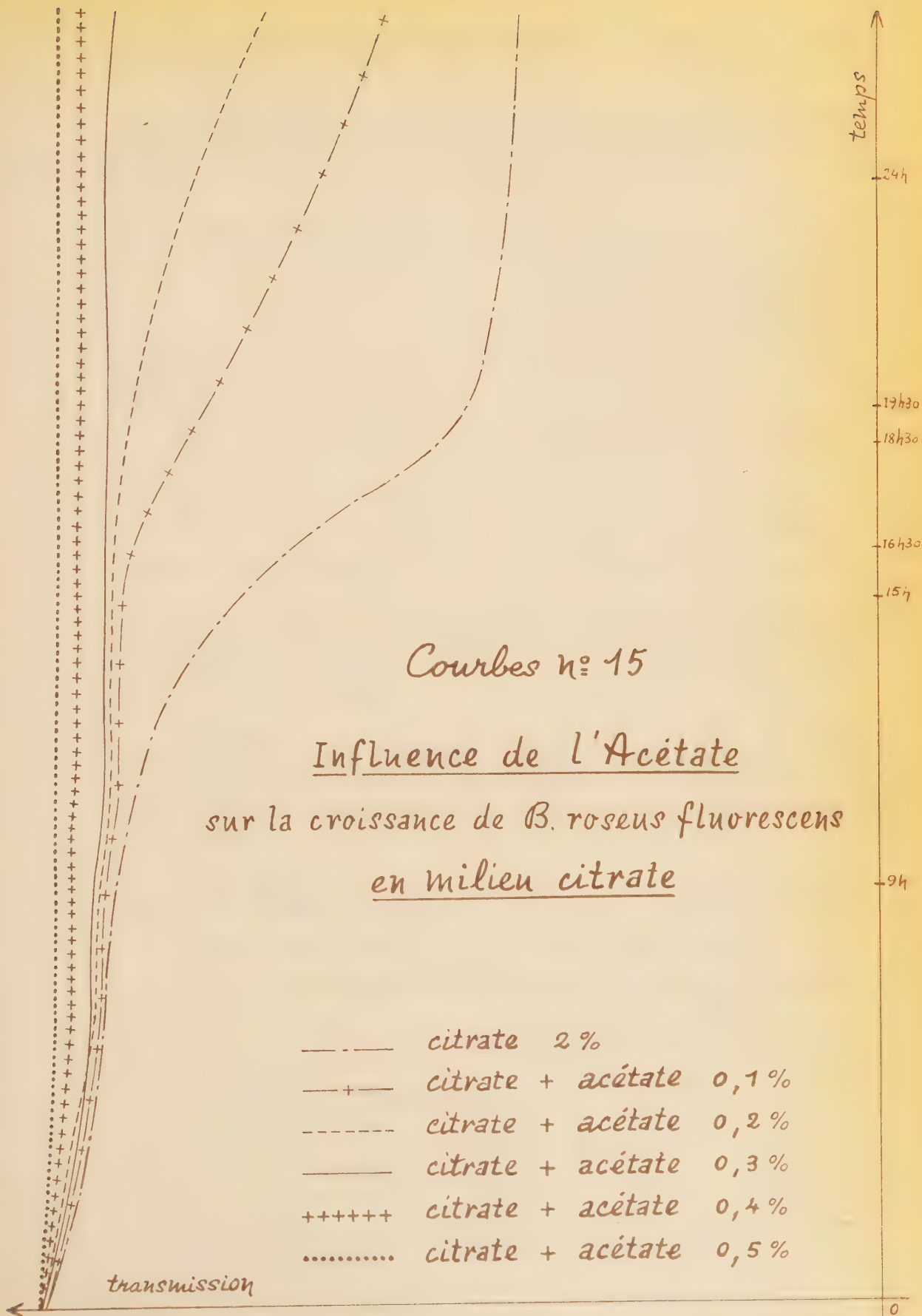
2- Influence de l'acétate sur la croissance en divers milieux organiques:

Nous avons vu que l'acétate seul ne favorisait pas la croissance de *B. roseus fluorescens*. Il était donc intéressant d'étudier si, incorporé dans les milieux à base de citrate de sodium ou de succinate d'ammonium, l'acétate n'aurait pas une autre influence sur la croissance de ce germe.

a) Influence de l'acétate sur la croissance en milieu citrate

Nous réalisons le protocole suivant:

n° des cuves du biophotomètre	composition du liquide de culture			Concentration en acétate
	milieu citraté à 2% & décanté.	sol. aqueux stérile d'acétate à 8%	suspension microbienne.	
1	8 ml	-	0,2 ml	0
2	7,9 ml	0,1 ml	"	0,1%
3	7,8 ml	0,2 ml	"	0,2%
4	7,7 ml	0,3 ml	"	0,3%
5	7,6 ml	0,4 ml	"	0,4%
6	7,5 ml	0,5 ml	"	0,5%



Nous laissons le biophotomètre fonctionner durant 30 heures.

Les courbes n° 15 représentent les enregistrements obtenus et, dans le tableau suivant figurent quelques points relevés sur les graphiques fournis par le biophotomètre:

	intensité du courant électrique enregis- trée en milliampères			
	9h.	14h	18h	24h.
citrate	29	22	7	1
citrate + acétate 0,1%	32	30	28	16
" " 0,2%	29	29	28	21
" " 0,3%	33	31	31	29
" " 0,4%	29	29	28	27
" " 0,5%	29	29	28	28

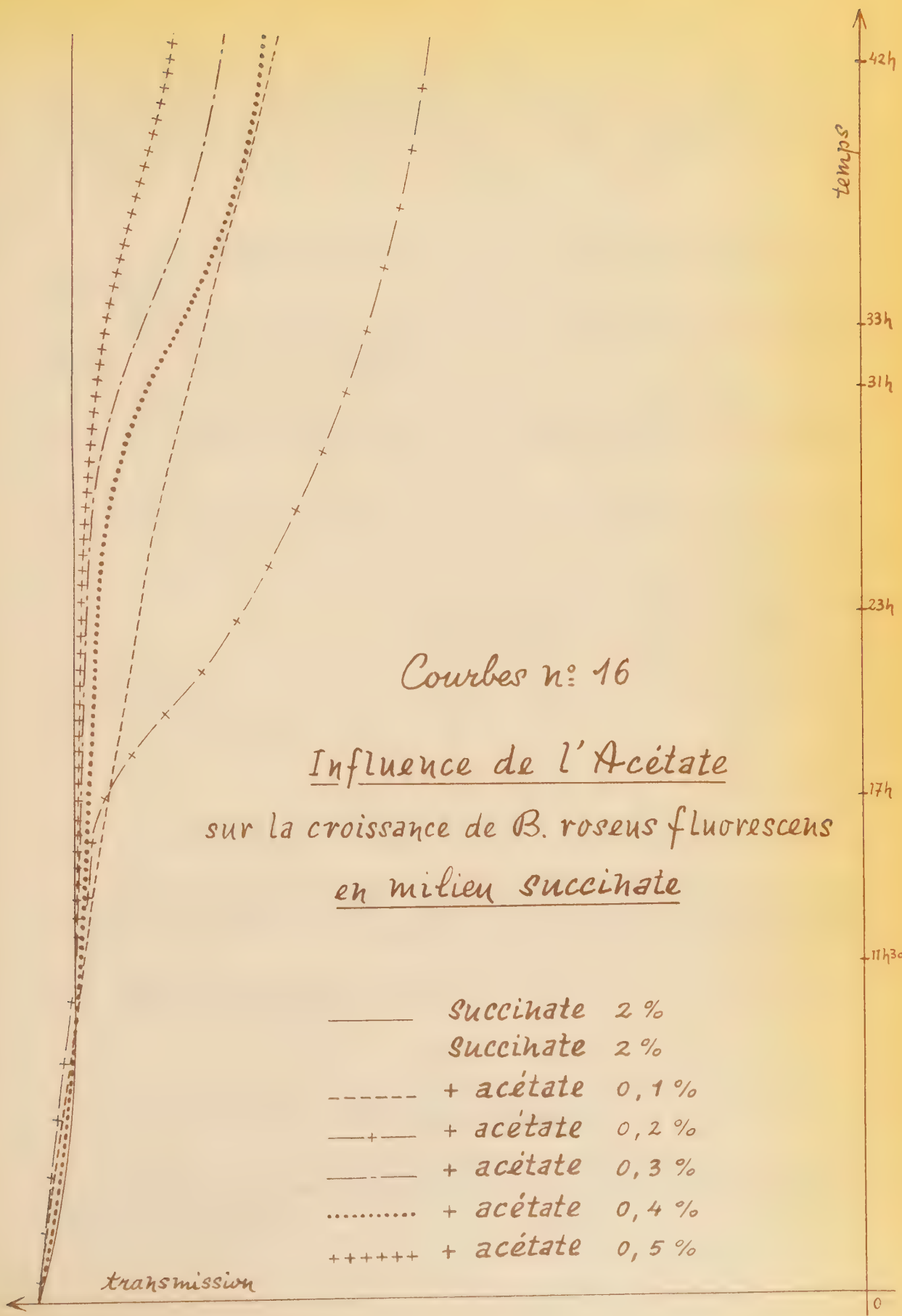
Les courbes obtenues, que traduisent les valeurs du tableau ci-dessus, montrent que l'acétate ne favorise pas la croissance de *B. roseus fluorescens* en milieu citraté à 2%.

Si des concentrations en acétate de 0,1 et 0,2% permettent encore un développement relativement intense du bacille, des concentrations supérieures sont très défavorables et donnent des taux de croissance très peu importants.

Dès la fin de nos expériences, nous avons mesuré le pH de chaque milieu.

Nous avons obtenu les valeurs suivantes:

	pH initial	pH terminal
citrate	6,4	8,3
citrate + acétate 0,1%	6,4	3,2
" " 0,2%	6,4	7,9
" " 0,3%	6,4	7,1
" " 0,4%	6,4	6,35
" " 0,5%	6,4	6,2



Courbes n° 16

Influence de l'Acétate
sur la croissance de *B. roseus fluorescens*
en milieu Succinate

- Succinate 2 %
- Succinate 2 %
- · - · - + acetate 0,1 %
- + — + acetate 0,2 %
- - - - + acetate 0,3 %
- + acetate 0,4 %
- + + + + + + acetate 0,5 %

Les valeurs du pH nous renseignent de la même façon que l'enregistrement biophotométrique sur l'action de l'acétate sur la croissance de *B. roseus fluorescens* en milieu citraté: elles diminuent parallèlement au taux de croissance.

b) Influence de l'acétate sur la croissance en milieu succinate

Nous suivons pour cette étude un protocole identique au précédent, en utilisant un milieu à base de succinate à 2%, privé de son précipité.

Après 46 et 48 heures de fonctionnement, nous arrêtons le biophotomètre. Nous obtenons une série de courbes, dont nous donnons la reproduction (courbes n° 16).

Le tableau suivant représente quelques points de ces courbes, relevés directement sur les enregistrements:

				intensité du courant électrique enregistrée en milliampères.				
				1Ch	18h	24h	36h	48h
succinate				36	35	32	28	13
succinate + acétate	0,1%			35	27	22	18	8
"	"	0,2%		32	28	17	10	0
"	"	0,3%		35	32	31	19	17
"	"	0,4%		35	32	30	17	9
"	"	0,5%		36	32	31	18	16

Nous voyons d'après ces résultats, que l'acétate favorise la croissance de *B. roseus fluorescens* lorsqu'il est incorporé à un milieu contenant de l'acide succinique (2%).

La concentration optima en acétate est de 0,2%, puis par ordre décroissant:

0,1% - 0,4% - 0,3% - 0,5%

Une trop forte concentration en acétate ne favorise plus le développement du germe étudié.

Dès la fin de nos expériences, nous avons mesuré les pH de chaque milieu nutritif et nous avons obtenu les résultats suivants:

			pH initial	pH terminal
succinate			6,4	7
succinate + acétate	0,1%		6,4	7,4
"	"	0,2%	6,4	7,7
"	"	0,3%	6,4	7
"	"	0,4%	6,4	7.3
"	"	0,5%	6,4	7

Toute consommation du substrat par *B. roseus fluorescens*, se traduisant par une élévation de pH, nous retrouvons là encore, le rôle favorisant de l'acétate aux faibles dilutions, la concentration optima étant de 0,2%.

CONCLUSIONS

B. roseus fluorescens utilise pour sa croissance, mais selon des taux variables, le pyruvate, le citrate, l'acétate, l' α céto glutarate, le succinate, le malate, le fumarate.

L'addition de pyruvate favorise la croissance de ce germe en milieu à base de succinate (concentration optima de 0,50%) et en milieu contenant du malate (concentration optima de 0,25 et 0,50%).

Le pyruvate n'a qu'un rôle très relatif sur le développement de *B. roseus fluorescens* en milieu citrate.

L'incorporation d'acétate au milieu contenant déjà 2% de succinate favorise la croissance de ce germe (concentration optima de 0,2%). Au contraire, la croissance se trouve gênée si l'acétate est additionné à un milieu contenant 2% de citrate.

II° ETUDE DE LA RESPIRATION ET DU METABOLISME

OXYDATIF DE *B. ROSEUS FLUORESCENS*

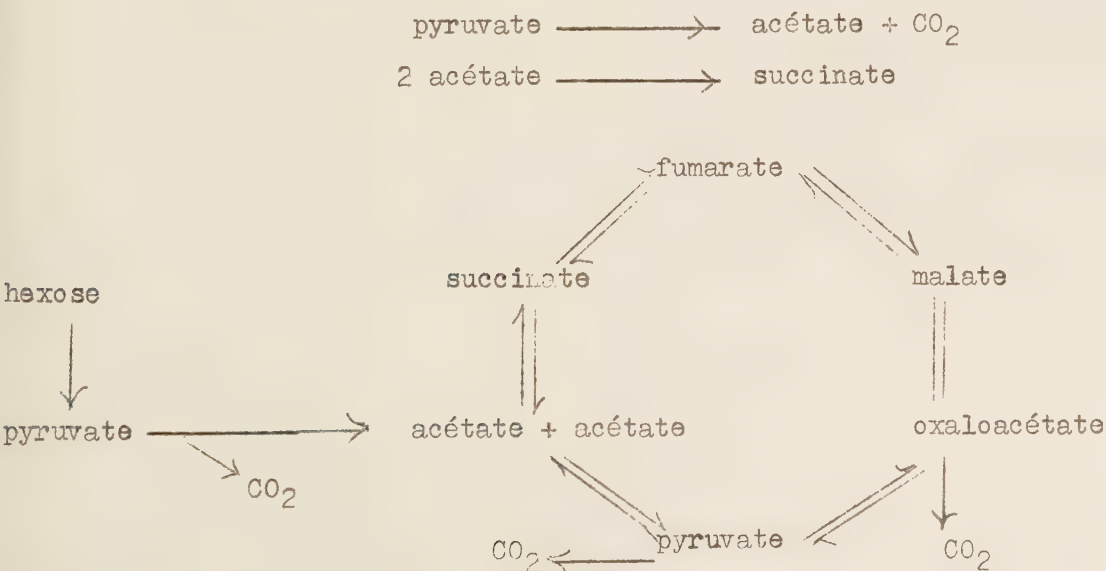
L'étude du métabolisme oxydatif des microorganismes et de leur respiration a fait l'objet de très nombreux travaux. Il est évident que la preuve de l'existence d'un cycle, genre cycle tricarboxylique, chez une bactérie, ne peut être établie que si cette bactérie est capable d'uti-

liser les intermédiaires de ce cycle.

Il faut cependant savoir que, chez les microorganismes, la présence d'un cycle respiratoire terminal a toujours été une source de doutes. Ne pouvant pas toujours appliquer les mêmes méthodes de recherche que dans le cas des tissus animaux, il est souvent difficile de conclure. S.J. AJL (269) indique que, si quelques bactéries seulement attaquent les acides tricarboxyliques, cela ne signifie pas obligatoirement qu'il n'existe pas, chez les autres, les enzymes nécessaires à cette utilisation: la perméabilité de la cellule bactérienne joue un rôle très important, puisque là où les "resting-cells" ne donnent aucun résultat, il peut y avoir attaque de ces acides une fois les cellules broyées et les membranes détruites.

Certaines bactéries utilisent dans leur métabolisme, un cycle semblable à celui de KREBS (dont nous avons donné un schéma p.7). C'est le cas de *Aerobacter aerogenes* cultivé sur citrate, d'*Acetobacter vinelandii* ou de certains *Pseudomonas* (272, 273). Par contre, *Azotobacter agilis* (271) ne posséderait pas ce cycle, du fait que ce germe n'est capable d'utiliser les principaux acides di- et tricarboxyliques qu'après une adaptation à ces intermédiaires, qu'il n'y a pas d'inhibition par le malonate et que l'incorporation d'acétate marqué n'aboutit ni à la formation de succinate marqué ni à celle d'oxaloacétate marqué.

AJL (269, 274, 275, 276) montra que, chez une souche de *Esch. coli*, l'oxydation de l'acétate débutait par une condensation du type Thunberg, suivie par une oxydation selon le cycle de Szent-Györgyi. Il proposait le schéma suivant:



KREBS (181) admettait déjà l'existence de deux cycles différents permettant l'utilisation de l'acétate par les levures: un cycle permettrait la croissance de la levure, un autre lui fournirait l'énergie nécessaire à son métabolisme.

Chez une espèce bactérienne, la coexistence de plusieurs cycles n'est pas à rejeter. Comme l'admet également LICHSTEIN (270), la nature de la condensation conduisant au cycle de KREBS ou à celui de SZENT-GYORGYI est controversée: il se peut qu'il existe plus d'un type de réaction.

De nombreux auteurs effectuèrent des études manométriques sur l'oxydation des acides di- et tricarboxyliques par différents germes: *B. cereus* (278), *Klebsiella pneumoniae* (279), *Escherichia coli* et *Aerobacter aerogenes* (274, 275, 276, 277), *Pasteurella pestis* (305), *Pseudomonas fluorescens* (273), *Penicillium chrysogenum* (308), *Streptomyces griseus* (309).

Selon le germe étudié, le taux d'oxydation des divers acides testés varie. Il peut même s'annuler: c'est ainsi que *Klebsiella pneumoniae* est incapable d'oxyder le citrate, tandis que cette bactérie oxyde rapidement le succinate, le fumarate, le malate, le pyruvate, et l'acétate.

Des résultats obtenus, il est alors possible de déterminer si le germe étudié possède un système enzymatique capable d'oxyder tous les intermédiaires des cycles de KREBS ou de SZENT-GYORGYI ou seulement quelques-uns.

Après avoir étudié dans le paragraphe précédent la croissance de *B. roseus fluorescens* sur divers acides organiques, chacun étant utilisé comme seule source de carbone, nous avons entrepris des études manométriques sur la respiration de ce germe en présence de ces acides.

La respiration des bactéries comme leur métabolisme, étant en majeure partie fonction des conditions du milieu dans lequel on les fait se reproduire, et plus particulièrement du pH de ce milieu, nous avons fixé le protocole suivant:

PROTOCOLE

Matériel nécessaire

- tampon phosphate de pH=6,9
- solution A: phosphate disodique à 11,87 g.‰
- solution B: phosphate monopotassique à 9,10 g.‰

Ce tampon est préparé en mélangeant 60 ml de A, à 40 ml de B.

Il est stérilisé par passage à l'autoclave (1/2 h, à 120°C).

- solutions aqueuses d'acides organiques, neutralisées par la quantité théorique de bicarbonate de sodium, et stérilisées par filtration sur bougie L₃.

Une culture âgée de 24 heures sur géose en boîtes de Roux, nous fournira les cellules non proliférantes de *B. roseus fluorescens* ("resting-cells"). Les cellules bactériennes sont d'abord lavées une fois à l'eau physiologique, puis au tampon phosphate de pH=6,9. Elles sont ensuite mises en suspension très dense dans ce même tampon, de façon à ce que 1 ml de cette suspension corresponde, d'après les dosages que nous avons effectués, à environ 0,6/0,8 mg d'azote bactérien (soit par fiole de Warburg, de 1,5 à 2 mg d'azote bactérien).

Les fioles de Warburg sont ainsi composées:

- dans la cupule centrale: 0,2 ml de solution de potasse à 10%
- dans le "side-arm" de la fiole: 0,2 ml de solution d'acide organique M/10 soit 20 micromolécules.
- dans la fiole elle-même: 2,8 ml de suspension de "resting-cells", dans le tampon phosphate de pH=6,9.

La respiration endogène normale (témoin) est mesurée dans une fiole où l'acide organique du "side-arm" a été remplacé par 0,2 ml de tampon phosphate.

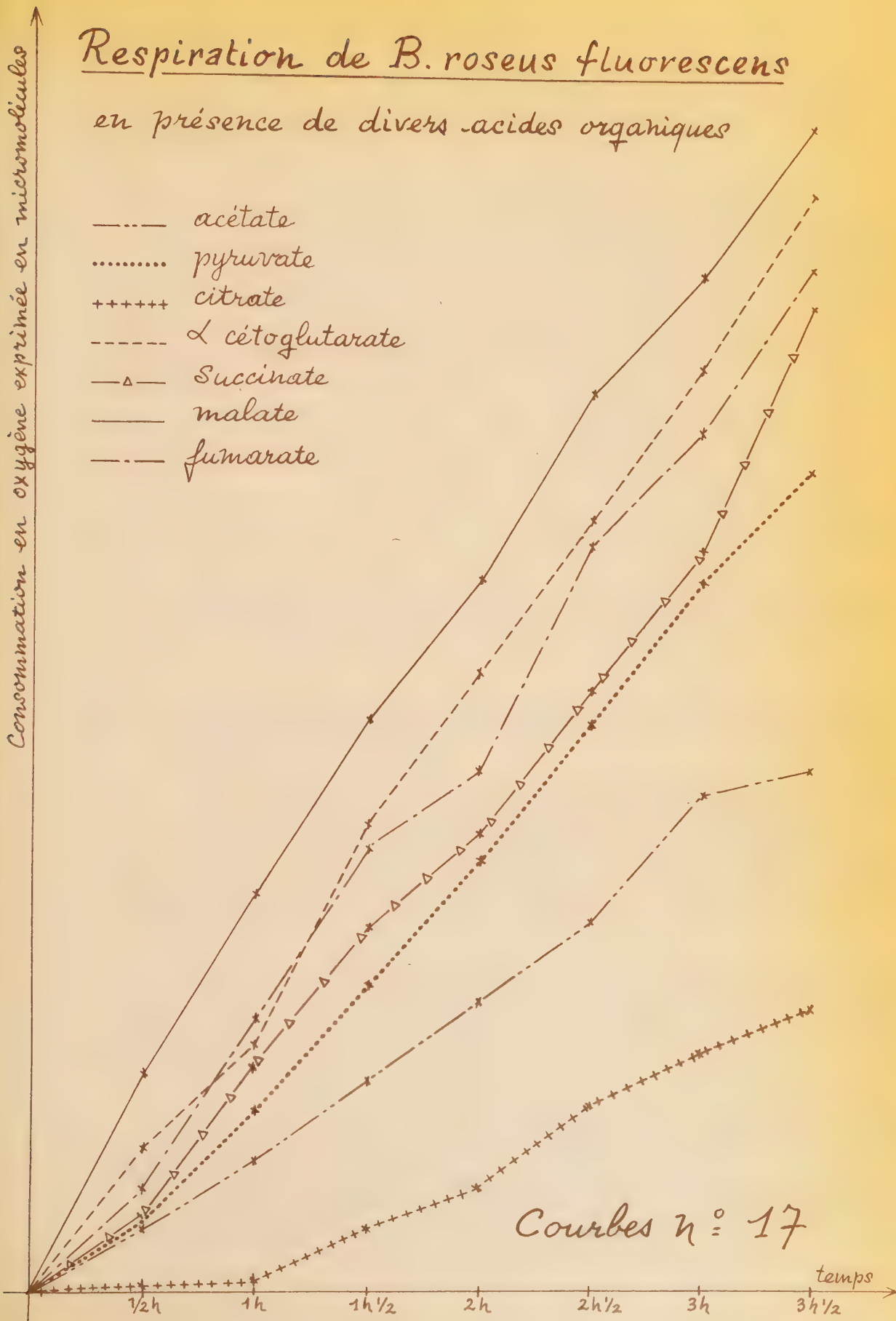
Chaque série d'expériences a été arrêtée 3h.30 après avoir versé le contenu du "side-arm" dans la fiole proprement dite.

Les lectures furent faites de 15 en 15 minutes.

RESULTATS

Nos résultats sont exprimés en micromolécules d'oxygène consommé par chaque fiole, dans les conditions expérimentales que nous venons d'énoncer.

La respiration endogène normale ayant été défalquée, ces chiffres représentent donc l'oxygène utilisé par les "resting-cells" de chaque fiole, pour oxyder les 20 mi-



cromolécules d'acide organique.

Nos résultats sont exposés dans le tableau suivant où nous avons classé, par ordre décroissant, les acides organiques selon leur taux d'oxydation par *B. roseus fluorescens*:

	Oxygène consommé dans nos conditions d'expérience (exprimé en micromolécules)						
	I	2	3	4	5	6	Moyenne
malate	20,25	24	27,1	20,2	24,6	12	21,3
α-cétoglutarate	19	24,9	22	14,6			20
fumarate	17,8	18	20				18,6
succinate	15	18	21,1	18,2	15,9	20,7	18
pyruvate	15,5	15	10,6	7,7	18,5		15
acétate	9,94	9,8	9,2	9,6			9,6
citrate	5	10,7	9,8	6,5	7,8	5,3	5,2

Les courbes n° 17 donnent la représentation de la consommation en oxygène (exprimée en micromolécules) de *B. roseus fluorescens*, en fonction du temps.

A) ACTION DE QUELQUES INHIBITEURS SUR LA RESPIRATION DE *B. ROSEUS FLUORESCENS*

Les inhibiteurs agissent en bloquant certaines réactions d'oxydation à un stade déterminé et permettent ainsi l'étude indirecte de ces processus. C'est pourquoi, après avoir étudié le métabolisme oxydatif de *B. roseus fluorescens*, nous avons recherché l'action d'inhibiteurs variés (malonate de sodium, fluorure de sodium, cyanure de potassium) sur ce métabolisme.

L'action du malonate sur les oxydations biologiques a été étudiée pour la première fois par T. THUNBERG, puis par JASTEL (324) et QUASTEL et WOOLBRIDGE (325). Ces auteurs constatèrent son action inhibitrice spécifique sur la succino-déshydrogénase.

C'est SZENT-GYÖRGYI (138) qui montra, grâce à cette inhibition spécifique, l'importance des acides en C₄ dans les oxydations biologiques. KREBS et EGGLESTON (326) démontrèrent la nature compétitive de cette inhibition: l'inhibition dépend non seulement de la concentration en malonate, mais aussi du rapport malonate. Ils montrèrent succinate

également que l'acide fumarique peut annuler cette inhibition.

L'action inhibitrice du fluorure de sodium sur la glycolyse du sang fut remarquée pour la première fois en 1890 par EFFRONT (327), puis par MAC LEOD (328) et EVANS (329). LIPIAN (330) montra que l'inhibition par le fluorure est due à la formation d'un complexe avec le fer, analogue à celui de la fluoréméthémoglobine. MEYERHOF et LOHMANN (331) trouvèrent que l'enzyme le plus sensible à l'action du fluorure est l'énolase et BOREI (332) pensait que cette inhibition se faisait de deux façons:

- a) dans la fermentation, le fluorure agirait sur l'énolase.
- b) dans la respiration, le fluorure attaquerait dans la chaîne d'oxydation, un transporteur à caractère voisin de celui des cytochromes c et b.

L'action des cyanures se porte surtout sur la cytochrome-oxydase, coupant ainsi toute la chaîne d'oxydation cellulaire.

BROH-KAHN et MIRSKY (352) montrèrent, qu'en présence de cyanure, *Esch. coli* était incapable d'utiliser l'oxygène atmosphérique comme source d'énergie. Ils considèrent la suite des réactions suivantes:

- (1) substrat + coenzyme $\xrightarrow{\quad}$ substrat oxydé + coenzyme réduit.
- (2) coenzyme réduit + ferment jaune $\xrightarrow{\quad}$ coenzyme + ferment jaune réduit
- (3) ferment jaune réduit + $O_2 \xrightarrow{\quad}$ ferment jaune + H_2O_2
- (4) $H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} H_2O + 1/2 O_2$

et établirent, qu'en présence de cyanure, seule la réaction (4) était inhibée.

BATELLI et STERN (333) puis DIXON (334), montrèrent que la respiration d'un grand nombre de cellules n'est que partiellement inhibée par le cyanure: il existerait donc au moins deux systèmes respiratoires, l'un sensible au cyanure, l'autre insensible.

Partie expérimentale

Dans toutes ces expériences réalisées avec la méthode manométrique de Warburg, nous avons utilisé des "resting-

cells" fournis par une culture de *B.roseus fluorescens* sur gélose et âgée de 24 heures. Les germes sont d'abord lavés à l'eau physiologique, puis au moyen d'une solution de tampon phosphate de pH=6,9 (de composition identique à celle utilisée lors des expériences sur la respiration sans inhibiteur); le dernier culot de centrifugation est mis en suspension dans ce même tampon, de façon que 1 ml de cette suspension ait une densité optique de 22 au photocolorimètre de Bonet-Maury à 640 m μ (filtre rouge).

I) Recherche de la concentration optima de substrat à employer pour les études sur les inhibiteurs

Nous réalisons plusieurs séries d'expériences en utilisant le glucose, le pyruvate de sodium et le succinate d'ammonium.

Nous cherchons à définir la concentration de substrat, qui provoque la consommation maxima d'oxygène par *B.roseus fluorescens*, durant 2h.30. Chaque fiole de Warburg contient:

- dans la cupule centrale: 0,2 ml d'une solution de potasse à 10%
- dans le "side-arm": 0,3 ml de solution de substrat à tester, de composition telle que la concentration finale soit de $\frac{M}{40}, \frac{M}{80}, \frac{M}{120}$
- dans la fiole: 2,4 ml de suspension bactérienne
0,3 ml de solution de tampon phosphate de pH=6,9

La respiration endogène ayant été défalquée, les consommations en oxygène de chaque fiole, sont exprimées en micromolécules dans le tableau suivant:

concentration finale du substrat		consommation en oxygène (micromolécules)
Glucose	M/40	14
"	M/80	13,2
"	M/120	13,1
Pyruvate	M/40	15,4
"	M/80	13,6
"	M/120	9,4
Succinate	M/40	25
	M/80	14
	M/120	7

D'après ces résultats, nous voyons que la consommation en oxygène par *B. roseus fluorescens*, est maxima pour une concentration finale en pyruvate et en succinate de M/40.

Avec le glucose, les résultats sont assez voisins, quelle que soit la concentration.

Nous avons donc poursuivi ces études sur l'inhibition de la respiration, en utilisant uniformément un substrat dont la concentration finale était de M/40.

2) Action du malonate de sodium sur la respiration de *B. roseus fluorescens* en présence de glucose, de pyruvate et de succinate

Chaque fiole de Warburg contient:

- dans la cupule centrale: 0,2 ml de solution de potasse à 10%
- dans le side-arm: 0,3 ml de solution de substrat M/4 (concentration finale: M/40)
- dans la fiole: 2,4 ml de suspension bactérienne
0,3 ml de malonate de concentration déterminée.

Nous réalisons pour chaque concentration d'inhibiteur, des témoins ne contenant que les germes et l'inhibiteur, afin de contrôler la respiration endogène en présence de ce dernier.

Nous réalisons également un témoin où *B. roseus fluorescens* oxyde le substrat, sans inhibiteur (en ce cas, les 0,3 ml de malonate sont remplacés par le même volume de tampon phosphate), et un témoin où nous mesurons uniquement la respiration endogène de la suspension microbienne (substrat du side-arm et inhibiteur de la fiole sont remplacés par un même volume de tampon phosphate).
Chaque expérience a duré 2h.30.

(a) action du malonate de sodium sur la respiration en présence de succinate -

nous avons obtenu les résultats suivants:

		rapport $\frac{\text{malonate}}{\text{succinate}}$	% inhibition
succinate M/40	{ malonate M/5	6	96 %
	{ malonate M/15	1,8	93 %
	+ { malonate M/50	0,6	86 %
	{ malonate M/75	0,3	36 %
	{ malonate M/100	0,2	0 %

Nous voyons donc qu'il y a bien inhibition par le malonate de l'oxydation du succinate par *B. roseus fluorescens*; et que cette inhibition est fonction, non seulement de la teneur en malonate, mais aussi du rapport malonate succinate .

(b) action du malonate de sodium sur la respiration
en présence de pyruvate

Nous avons obtenu une inhibition de 58% de l'oxydation du pyruvate avec une concentration en malonate de M/5, tandis qu'une concentration de M/15 ne donnait aucun résultat.

(c) action du malonate de sodium sur la respiration
en présence de glucose

Nous avons obtenu les résultats suivants:

	% inhibition
glucose M/40 (+ malonate M/5	97 %
(+ malonate M/15	28 %

Conclusion

Le malonate de sodium inhibe la respiration de *B. roseus fluorescens* en présence de:

succinate
pyruvate
glucose

Le malonate inhibe à 96 et 97% l'oxydation du succinate et du glucose, et à 58% celle du pyruvate.

Le malonate étant un inhibiteur de la succino-déshydrogénase, nous pouvons en conclure que la dégradation par *B. roseus fluorescens* du pyruvate et du glucose passe par l'acide succinique, et par là même, par l'intermédiaire des acides en C₄ (observations de SZENT-GYÖRGYI - 138-).

3) Action du fluorure de sodium sur l'oxydation de divers substrats par *B. roseus fluorescens*:

Le contenu de chaque fiole de Warburg est constitué de la même manière que lors de nos expériences sur l'inhibition par le malonate. Nous remplaçons seulement les 0,3 ml de malonate par 0,3 ml d'une solution de fluorure de sodium de concentration convenable.

Pour effectuer les témoins sans inhibiteur, nous remplaçons ce dernier par la même quantité de tampon phosphate de pH=6,9.

Nous avons réalisé des concentrations finales en fluorure de sodium égales à M/10 et M/30, et essayé l'action de cet inhibiteur sur les corps suivants:

succinate d'ammonium
pyruvate de sodium
malate de sodium
fumarate de sodium
glucose

Chaque expérience a duré 2h.30.

Nous avons groupé les résultats obtenus dans les conditions expérimentales que nous avons fixées, dans le tableau suivant; la consommation en oxygène y est exprimée en micromolécules.

	consommation oxygène (en micromolécules).	% inhibition
succinate	12	
succinate + fluorure M/10	0	100 %
succinate + fluorure M/30	0	100 %
pyruvate	15,1	
pyruvate + fluorure M/10	8,2	46 %
pyruvate + fluorure M/30	11,4	25 %
malate	9	
malate + fluorure M/10	2,8	68 %
malate + fluorure M/30	9,2	0 %
fumarate	12	
fumarate + fluorure M/10	7,5	37 %
fumarate + fluorure M/30	12	0 %
glucose	9,5	
glucose + fluorure M/10	0	100 %
glucose + fluorure M/30	8,2	14 %

D'après ces résultats, nous voyons que le fluorure inhibe surtout la respiration de *B. roseus fluorescens* en présence de succinate, de malate et de glucose.

L'inhibition existe, mais à des taux moins élevés, en présence de fumarate et de pyruvate.

D'après les observations de MEYERHOF et de LOHMANN (331), nous pouvons donc conclure à la présence d'une énolase chez *B. roseus fluorescens*.

4) Action du cyanure de potassium sur l'oxydation de divers substrats par *B. roseus fluorescens*

Nous répartissons dans chaque fiole de Warburg:

- dans la cupule centrale: 0,2 ml d'une solution à égal volume de potasse à 10% et de cyanure de potassium M/15
- dans le side-arm: 0,3 ml de solution de substrat M/4 (concentration finale: M/40).
- dans la fiole: 2,4 ml de suspension bactérienne
0,3 ml de cyanure de potassium en solution M/15
(concentration finale: M/150).

Nous réalisons des témoins (respiration endogène avec ou sans cyanure, oxydation du substrat sans cyanure) comme dans les expériences précédentes.

Nous avons utilisé pour l'inhibiteur une concentration finale de M/150 et essayé son action sur l'oxydation par *B. roseus fluorescens* des composés suivants:

glucose
pyruvate
succinate
malate

Nous groupons nos résultats dans le tableau suivant:

	consommation en oxygène exprimée en micromolécules	% d'inhibition
glucose M/40	7,4	
glucose M/40 + cyanure M/150	2,6	65 %
succinate M/40	14,4	
succinate M/40+cyanure M/150	3,7	75 %
malate M/40	15,5	
malate M/40 + cyanure M/150	5,6	64 %

D'après ces résultats, nous voyons que le cyanure à la concentration de M/150 inhibe l'oxydation du glucose, du malate et du succinate par *B. roseus fluorescens*.

Observations sur l'action du cyanure de potassium sur l'oxydation du pyruvate par *B. roseus fluorescens*

Notre attention fut attirée, dès nos premières recherches, par les résultats obtenus avec le cyanure de potassium en présence de pyruvate: à la concentration de M/150, le cyanure n'a aucune influence sur l'oxydation de ce substrat par *B. roseus fluorescens*.

Nous avons tout d'abord essayé de déterminer si des concentrations supérieures en cyanure n'inhiberaient pas cette oxydation: c'est dans ce but que nous avons effectué une nouvelle série d'expériences, en utilisant comme substrat, du pyruvate M/4 (concentration finale M/40) et comme inhibiteur le cyanure de potassium aux concentrations finales suivantes: M/50, M/100, M/150.

Dans les tableaux suivants, nous indiquons la valeur de la respiration endogène de *B. roseus fluorescens* en présence de différentes concentrations de cyanure et la moyenne des résultats obtenus lors des expériences concernant l'action de cet inhibiteur sur l'oxydation du pyruvate. La consommation en oxygène est exprimée d'une part, en mm³, d'autre part, en micromolécules.

Les témoins n'ont pas été défalqués.

Action du cyanure de potassium sur la respiration endogène de B. roseus fluorescens:

- durée des expériences: 2h.30 -

concentration finale en cyanure de potassium	oxygène consommé exprimé en:		% d'inhibition
	mm ³	micromol.	
nulle	811	36	-
M/150	156	7	80 %
M/100	148	6,6	83 %
M/50	125	5,6	85 %

Oxydation du pyruvate par B. roseus fluorescens en présence de cyanure de potassium

- durée des expériences: 2h.30 - (témoins non défalqués)

	oxygène consommé exprimé en mm ³			
	sans CNK	CNK M/150	CNK M/100	CNK/ M/50
pyruvate M/40	1000	832	837	725
témoin: respiration endogène	811	163	150	127

D'après ces tableaux, nous voyons que le cyanure inhibe très fortement la respiration endogène de B. roseus fluorescens. Au contraire, si l'on déduit du volume d'oxygène consommé en présence de pyruvate et de cyanure, celui du témoin réalisé dans les mêmes conditions, on pourrait croire à une activation de l'oxydation du pyruvate par B. roseus fluorescens sous l'effet du cyanure.

AUBEL et ses collaborateurs (350) observèrent que le cyanure à une concentration de M/150, inhibait la respiration de Esch. coli en présence des acides en C₄, tandis qu'en présence de pyruvate, l'inhibition était nulle. Ils concluaient à la formation, en milieu pyruvate, d'une cyanhydrine non toxique.

On peut donc penser que dans nos expériences, se formerait un produit similaire: en présence de pyruvate, l'action toxique du cyanure vis à vis de la respiration endogène n'aurait plus lieu, ramenant ainsi la respira-

tion endogène à un taux voisin de celui de la normale, ce qui donnerait sensiblement la même quantité d'oxygène consommé par *B. roseus fluorescens*. Le cyanure n'a donc aucune influence sur l'oxydation du pyruvate par ce germe; celle-ci pourrait de ce fait, s'effectuer au moyen d'un système respiratoire insensible à l'action inhibitrice des cyanures. C'est ce qui nous a conduit à rechercher la présence chez *B. roseus fluorescens* de déshydrogénases, enzymes insensibles à l'action des cyanures.

B) RECHERCHE DES DESHYDROGENASES DE B. ROSEUS FLUORESCENS.

Pour rechercher la présence de déshydrogénases chez *B. roseus fluorescens*, nous avons utilisé la technique de THUNBERG, préconisée par UMBREIT (204) et par AUBEL (350).

Nous avons déjà rencontré une difficulté dans le fait que *B. roseus fluorescens* est tellement avide d'oxygène que ses suspensions décolorent très rapidement en anaérobiose la solution de bleu de méthylène utilisée en général pour ces recherches (1/10.000). Il nous a donc fallu, au départ, utiliser une solution de bleu de méthylène très concentrée et surtout vérifier nos résultats en effectuant chaque fois des témoins.

PROTOCOLE

Les germes que nous utilisons, proviennent d'une culture de *B. roseus fluorescens* sur gélose, âgée de 24 heures; ils sont d'abord lavés à l'eau physiologique, puis au moyen d'une solution tampon phosphate de pH=6,9. Le dernier culot de centrifugation est mis en suspension dans ce même tampon, de façon à obtenir une suspension microbienne de densité semblable à celle utilisée lors des précédentes expériences (densité optique de 1 ml=22, prise au photocolorimètre de BONET-MAURY, à 640 m μ).

Dans un tube de Thunberg, nous répartissons:

- (0,25 ml de substrat M/4 à tester (concentration finale:
A (0,75 ml de solution tampon phosphate de pH=6,9 M/40)
(0,5 ml de solution aqueuse de bleu de méthylène à 0,1%

B (0,5 ml de solution tampon phosphate de pH=6,9
(0,5 ml de suspension bactérienne réalisée dans la solution tampon phosphate de pH=6,9

Nous réalisons les témoins en remplaçant le substrat

à tester par une même quantité de solution tampon de pH =6,9.

Après avoir fait le vide, nous versons le contenu de A dans B et nous plaçons les tubes au bain-marie à 25°C. Nous effectuons des lectures toutes les 5 minutes.

Nous avons recherché la présence chez *B. roseus fluorescens* de deshydrogénases pour les substrats suivants:

glucose, pyruvate de sodium, citrate de sodium, succinate d'ammonium, malate de sodium.

RESULTATS

Alors que les témoins restent colorés, une décoloration rapide du bleu de méthylène (10 à 15 minutes) par *B. roseus fluorescens* est constatée en présence des substrats suivants:

glucose
pyruvate
citrate
succinate

La décoloration en présence de malate est très faible après 40 minutes.

B. roseus fluorescens possède donc des deshydrogénases très actives vis à vis du glucose, du pyruvate, du citrate, du succinate, la deshydrogénase vis à vis du malate étant moins active.

CONCLUSIONS SUR LA RESPIRATION DE

B. ROSEUS FLUORESCENS EN PRESENCE DE DIVERS

SUBSTRATS

- 1) *B. roseus fluorescens* est capable d'oxyder, mais à des taux variables, les principaux intermédiaires des cycles di- et tricarboxyliques.
- 2) L'action inhibitrice du malonate de sodium s'exerce sur l'oxydation par ce germe du glucose, du pyruvate et du succinate.

- 3) La dégradation du glucose et du pyruvate par *B. roseus fluorescens* passe par l'intermédiaire des acides en C₄.
- 4) L'action inhibitrice du fluorure se manifeste sur l'oxydation du glucose, du pyruvate, du succinate, du malate, du fumarate.
B. roseus fluorescens possède donc une énolase.
- 5) L'oxydation du glucose, du succinate et du malate se fait par une voie enzymatique sensible au cyanure de potassium, tandis que celle du pyruvate s'effectue par une voie insensible à cet inhibiteur.
- 6) *B. roseus fluorescens* possède des déshydrogénases actives vis à vis du glucose, du pyruvate, du citrate et du succinate. La déshydrogénase malique est bien moins active.

III° - CULTURE DE *B. ROSEUS FLUORESCENS* EN PRESENCE DE
=====

DIVERS ACIDES ORGANIQUES: RECHERCHE DE CES COMPOSES
=====

EXISTANT A L'ETAT LIBRE DANS LES MILIEUX DE CULTURE
=====

De même que nous avons recherché les acides aminés libres existant dans différents milieux de culture de *B. roseus fluorescens*, nous nous sommes proposée l'étude des acides organiques libres pouvant se trouver dans ces mêmes milieux de culture.

Nous utilisons le milieu de base, que nous avons précédemment indiqué (p.100). Mais nous employons une concentration en acide bien supérieure, puisqu'elle est uniformément de 2% pour ces expériences (sauf pour l'acide pyruvique, dont la proportion n'est que de 0,75%).

Les milieux sont répartis dans des fioles d'Erlenmeyer à raison de 100 ml par fiole et stérilisés soit par filtration sur bougie L₃, soit à l'autoclave (115°C durant 30 minutes) selon la nature chimique de l'acide incorporé.

L'ensemencement des milieux est effectué avec une suspension en eau distillée de *B. roseus fluorescens* dont les cellules proviennent d'une culture âgée de 24 heures, préalablement lavées en eau physiologique. Les fioles sont alors placées à 25°C et examinées journellement. Les extractions sont effectuées après 3 jours et 8 jours, sur le liquide obtenu après centrifugation de la culture.

LES ACIDES CETONIQUES sont directement extraits du milieu sous forme de leur 2-4 dinitrophénylhydrazone, selon la récente technique de CAVALLINI et FRONTALI (207) que nous avons indiquée dans un chapitre précédent (I^o partie, chapitre II, p.65).

Nous effectuons leur chromatographie sur papier Schleicher et Schull n° 2043 A, avec le solvant suivant: (208)

butanol	70 ml
éthanol	10 ml
ammoniaque 0,5 N	20 ml

durant I4 à I6 heures.

Après séchage, une révélation n'est pas nécessaire: les spots des différentes hydrazones sont directement visibles grâce à leur couleur jaune. Nous avons précédemment indiqué (I^o partie, chapitre II, p.67), que l'emploi de l'ultra-violet pouvait faciliter la lecture de ces chromatogrammes.

Nous avons contrôlé nos résultats par électrophorèse, selon la méthode de TRAUBER (-243- et I^o partie, chapitre III, p.74).

Une autre partie du centrifugat de culture est acidifiée à un pH inférieur à 3 par addition d'acide sulfurique, et sert à la recherche des ACIDES ORGANIQUES autres que les acides cétoniques (ceux-ci sont en effet plus nettement identifiés par leur dinitrophénylhydrazone).

Après acidification, les acides organiques sont extraits par l'éther sulfurique comme nous l'avons précédemment indiqué (I^o partie, chapitre II, p.61). Nous effectuons leur chromatographie sur papier Schleicher et Schull n° 2043 A, selon la technique de CHEFFTEL, MUNIER et MACHEBOEUF (222). Le solvant employé est le mélange suivant:

propanol 50 ml
eucalyptol 50 ml
acide formique 20 ml
eau Q.S.

et la chromatographie est faite durant 8 à 9 heures.

Après séchage, nous révélons les spots des acides organiques par pulvérisation, soit d'une solution alcoolique de bleu de bromophénol (p.63), soit de la solution alcoolique d'hélianthine dont nous avons préconisé l'emploi (p.64).

La lecture du chromatogramme est faite immédiatement après la révélation: il est en effet impossible de la différer plus de 24 heures, car les spots s'atténuent avec le temps.

Nos expériences ont porté sur des milieux préparés à partir du milieu de base déjà cité (p.100), auquel nous ajoutons l'un des acides organiques suivants:

pyruvate	0,75%
α-cétoglutarate)	
acétate	)
citrate	) 2%
succinate	)
malate	)
fumarate	)

Tous ces acides sont incorporés sous forme de leur sel de sodium, à l'exception du succinate dont nous utilisons le sel d'ammonium.

Nous avons également essayé de déterminer l'influence de l'addition de pyruvate ou d'acétate à divers milieux, sur la formation et l'utilisation des acides organiques. Nous avons donc utilisé des milieux qui contenaient:

citrate 2% + pyruvate 0,50%
succinate 2% + pyruvate 0,50%
malate 2% + pyruvate 0,50%
citrate 2% + acétate 0,20%
succinate 2% + acétate 0,20%

Enfin, nous avons recherché les acides cétoniques élaborés par *B. roseus fluorescens* cultivé en milieu synthétique L₁ et dans le milieu de base déjà signalé auquel nous ajoutons 1% de glucose.

B. roseus fluorescens trouvera donc dans chacun de ces milieux, une source de carbone (acide organique ou glucose) distincte de la source d'azote (chlorure d'ammonium). Le cas du milieu L_I est spécial, puisque l'asparagine qu'il contient est à la fois une source de carbone et d'azote. (Nous n'avons d'ailleurs recherché dans ce milieu que les acides cétoniques formés, et ce, à titre de témoin).

En cultivant B. roseus fluorescens sur ces différents milieux, nous avons voulu étudier l'assimilation des divers acides organiques incorporés et leur transformation éventuelle en autres acides organiques. Nos résultats ont été obtenus après de très nombreux essais chromatographiques, car cette méthode d'investigation est bien plus difficile à réaliser et surtout à réussir parfaitement, que la chromatographie appliquée aux acides aminés.

Nous envisagerons successivement:

- A) la recherche des acides organiques libres des cultures de B. roseus fluorescens
- B) le dosage colorimétrique des acides cétoniques libres des cultures de B. roseus fluorescens.

A) RECHERCHE DES ACIDES ORGANIQUES LIBRES DES CULTURES DE B. ROSEUS FLUORESCENS

Nous avons groupé tous nos résultats dans un tableau, afin de faciliter leur lecture et leur comparaison.

Dans ce tableau n° VII, nous indiquons les acides organiques (acides di et tri-carboxyliques, et acides cétoniques) trouvés libres dans les milieux précédemment signalés, après culture de B. roseus fluorescens pendant 3 jours et 8 jours, et recherchés selon les méthodes indiquées.

Observations

1° Nous avons extrait les acides cétoniques du milieu à base de malate 2% + pyruvate 0,50 % après 15 jours de

- TABLEAU N° VII -

Acides organiques libres des milieux de culture de *B.roseus fluorescens*

	Acides di et tricarboxyliques		Acides cétoniques	
	3 jours	8 jours	3 jours	8 jours
PYRUVATE 0,75%	pas d'acides organiques retrouvés par nos méthodes	pas d'acides organiques retrouvés par nos méthodes	pyruvate α céto-glutarate.	pyruvate α céto-glutarate
α CETOGLUTARATE 2 %	citrate succinate	citrate succinate	α céto-glutarate	α céto-glutarate pyruvate (traces)
CITRATE 2%	citrate succinate	citrate succinate	α céto-glutarate pyruvate (traces)	α céto-glutarate pyruvate
CITRATE 2% + PYRUVATE 0,50%	citrate succinate	citrate succinate	pyruvate	pyruvate (traces)
CITRATE 2% + ACETATE 0,20%	citrate succinate	succinate	pyruvate α céto-glutarate	pyruvate α céto-glutarate
SUCCINATE 2%	succinate	succinate	α céto-glutarate	α céto-glutarate pyruvate (traces)
SUCCINATE 2% + PYRUVATE 0,50%	succinate	succinate	pyruvate α céto-glutarate	pyruvate α céto-glutarate
SUCCINATE 2% + ACETATE 0,20%	succinate	succinate	α céto-glutarate	α céto-glutarate pyruvate (traces)
MALATE 2%	malate	malate	pyruvate α céto-glutarate	pyruvate α céto-glutarate (traces)
MALATE 2% + PYRUVATE 0,50%	malate succinate	malate succinate fumarate	pyruvate	pyruvate
FUMARATE 2%	fumarate	fumarate malate	pyruvate α céto-glutarate	pyruvate α céto-glutarate
GLUCOSE 1%			pyruvate α céto-glutarate	pyruvate α céto-glutarate
L _I			pyruvate α céto-glutarate (traces)	pyruvate α céto-glutarate (traces)

culture. Nous pensions ainsi trouver l' α céto-glutarate qui aurait pu se former à partir du pyruvate. Mais nous n'avons retrouvé que l'hydrazone correspondant au pyruvate.

2° Nous avons eu quelques difficultés pour les cultures en milieu à base d'acétate à 2%.

Comme pour l'étude des amino-acides, il nous a fallu utiliser une suspension de germes très dense pour commencer les milieux. Malgré cela, nous n'avons pu réaliser des chromatogrammes pour l'étude des acides organiques; de plus, la quantité d'hydrazones extraite fut si faible que la chromatographie des gouttes, même très chargées, ne nous a pas donné de spots distincts. (Nous avons même essayé de pulvériser sur les chromatogrammes une solution de soude 2 N: la coloration brune se développant sous l'influence de cet alcali à l'emplacement des spots, aurait pu nous permettre de les déceler plus facilement; il n'en fut malheureusement rien).

Le dosage des acides cétoniques en bloc, nous montre d'ailleurs la faible quantité de ces acides organiques formée.

Mais si *B. roseus fluorescens* présente une activité métabolique peu importante dans un milieu où l'acétate est la seule source de carbone, il est cependant toujours vivant dans ce milieu. Pour le vérifier, nous avonsensemencé 1 à 2 ml de culture de *B. roseus fluorescens*, en eau peptonée et en milieux synthétiques L₁ et L₂: ce germe cultivé en milieu à base d'acétate, reste capable (même après 1 mois de séjour en ce milieu), de se multiplier de nouveau normalement en eau peptonée et de produire son pigment rouge dans les milieux synthétiques. Il a, de plus, conservé tous ses caractères morphologiques et biochimiques normaux.

B) DOSAGE COLORIMETRIQUE DES ACIDES CETONIQUES TOTAUX RETROUVES DANS LES CULTURES DE *B. ROSEUS FLUORESCENS*

Les acides cétoniques ont été directement extraits des milieux de culture par la méthode de CAVALLINI et FRONTALI (207) - p.65.- Nous avons réalisé leur chromatographie à partir de la solution extractive ammoniacale qui nous a servi également au dosage colorimétrique de

ces composés.

TECHNIQUE

Nous mélangeons:

- 0,1 ml de solution extractive ammoniacale
(ce qui correspond à 0,8 ml de culture)
- 5,9 ml de solution à parties égales: $\begin{cases} \text{CO}_3\text{Na}_2 & 10\% \\ \text{NaOH} & 2N \end{cases}$

Il se développe une coloration rouge-brun, plus ou moins foncée selon la teneur en céto-acides.

Après 15 minutes de contact, on lit la densité optique au moyen de photolorimètre de BONET-MAURY (520 m μ et filtre vert).

Si la coloration est trop intense, nous diluons au moyen de la solution alcaline. Si, au contraire, la coloration est trop faible, nous réalisons le même protocole en prenant une prise d'essai plus importante.

Nous mesurons également dans les mêmes conditions, la densité optique de la seule solution alcaline, et celle d'un témoin.

Nous réalisons le témoin de la façon suivante:

- 0,1 ml de solution étalon de DNP hydrazone du pyruvate
- 0,1 ml " " " " " de l'ac. céto-glutarate
- 5,8 ml de solution de carbonate de sodium à 10% et de soude 2N

Les hydrazones témoins ont été préparées selon le protocole indiqué précédemment (1^o partie, chapitre II, p.66).

La détermination de la densité optique de ce mélange (correspondant à 0,0016 g. d'acide cétonique), nous permet d'établir, par simple comparaison, la teneur en acide cétonique des milieux de culture de *B. roseus fluorescens*.

Les résultats, exprimés en grammes d'acide cétonique pour 100 ml de culture sont rassemblés dans le tableau n^o VIII.

- TABLEAU N° VIII -

Dosage des acides cétoniques totaux retrouvés dans les cultures
de *B.roseus fluorescens*

milieux de culture	teneur primitive du milieu en acides cétoniques	3 jours		8 jours	
		acides cétoniques retrouvés en g.‰	Variation du taux des acides cé- toniques en g.‰	acides cétoniques retrouvés en g.‰	Variation du taux des acides cétoniques en g.‰
L _I	-	I,15	+ I,15	I,23	+ I,23
GLUCOSE 1‰	-	0,61	+ 0,61	0,65	+ 0,65
PYRUVATE 0,75‰	0,75	I	+ 0,25	0,96	+ 0,21
α CETOGLUTARATE 2‰	2	0,60	consomma- tion - I,4	I	consomma- tion - 1
CITRATE 2 ‰	-	0,12	+ 0,12	0,63	+ 0,63
CITRATE 2‰ + PYRUVATE 0,50‰	0,50	0,94	+ 0,44	0,1	consommation - 0,4
CITRATE 2‰ + ACETATE 0,2 ‰	-	0,25	+ 0,25	0,24	+ 0,24
MALATE 2 ‰	-	I,2	+ I,2	I,8	+ I,8
MALATE 2 ‰ + PYRUVATE 0,50‰	0,50	I,33	+ 0,83	I,36	+ 0,86
SUCCINATE 2 ‰	-	0,53	+ 0,53	0,14	+ 0,14
SUCCINATE 2‰ + PYRUVATE 0,50‰	0,50	I,2	+ 0,7	0,55	+ 0,05
SUCCINATE 2‰ + ACETATE 0,2 ‰	-	I	+ I.	I,2	+ I,2
FUMARATE 2‰	-	0,12	+ 0,12	0,24	+ 0,24
ACETATE 2‰	-	traces (0,0015)	traces	traces (0,006)	traces

D'après ces résultats, nous voyons que *B. roseus fluorescens* élabore des acides cétoniques à partir de tous les acides di- et tricarboxyliques essayés.

Pour la plupart, les taux d'acides cétoniques formés après 8 jours de culture, sont supérieurs à ceux obtenus après 3 jours de culture.

Les dosages effectués en milieu pyruvate (0,75%), α cétooglutarate (2%), citrate et pyruvate (0,50%), succinate (2%), succinate et pyruvate (0,50%), montrent, au contraire, une diminution du taux d'acides cétoniques après 8 jours de culture: *B. roseus fluorescens* les utilise donc pour ses besoins nutritifs.

Nous noterons également:

a) le taux très faible d'acides cétoniques dans les cultures où la seule source de carbone est fournie par l'acétate.

b) le rôle accélérateur du pyruvate dans la consommation des acides cétoniques par *B. roseus fluorescens* en milieu citraté (2%) tandis que l'acétate n'a que peu d'influence et laisse le taux des acides cétoniques pratiquement identique après 3 jours ou 8 jours de culture.

CONCLUSIONS

B. roseus fluorescens utilise les principaux acides di- et tricarboxyliques intermédiaires du cycle de KREBS (pyruvate, citrate, α cétooglutarate, succinate, malate, fumarate).

Ce germe transforme ces acides organiques en divers autres composés.

C'est ainsi qu'il élabore du SUCCINATE à partir du citrate (seul ou associé au pyruvate ou à l'acétate), de l' α cétooglutarate, du malate, accompagné de pyruvate.

Si *B. roseus fluorescens* est cultivé dans un milieu contenant de l' α cétooglutarate, nous retrouvons du CITRATE; cultivé dans un milieu à base de malate et de pyruvate, il forme du FUMARATE.

Nous observons la formation de MALATE, après 8 jours de culture en milieu fumarate.

B. roseus fluorescens élabore des acides cétoniques à partir de tous les acides organiques utilisés, du glucose et des substances (asparagine, glycérine), contenues dans le milieu L_I.

Ce germe dégrade le glucose en passant par le stade pyruvate.

B. roseus fluorescens produit de l'α CETOGLUTARATE à partir de:

glucose
pyruvate
citrate
citrate + acétate
succinate
succinate + pyruvate
succinate + acétate
malate
fumarate
asparagine et glycérine (milieu L_I)

L'addition de pyruvate à un milieu contenant du citrate ou du malate, ne donne plus lieu à la production d'α cétooglutarate par *B. roseus fluorescens*, alors que cet acide est toujours présent dans les cultures de ce germe sur un milieu contenant chacun de ces acides organiques séparément.

La présence de succinate (dans les cultures en milieu renfermant citrate + pyruvate), de succinate et de fumarate (dans les cultures en milieu contenant malate + pyruvate), nous permet de conclure à l'utilisation de tout l'α cétooglutarate éventuellement formé par *B. roseus fluorescens* et à la transformation de cet acide cétonique en un acide organique, intermédiaire inférieur des cycles carboxyliques.

- CHAPITRE IV -

=====

QUELQUES OBSERVATIONS SUR LA CHROMOGENESE DE

B. ROSEUS FLUCRESCENS

Nous savons que les pigments bactériens exigent des conditions précises pour se manifester. Si certaines bactéries sont capables de produire leur pigment sur les milieux usuels (*B. prodigiosus*, *B. violaceum*, *Chromobacterium chocolateum*, *B. pyocyanus pyocyanogenes* ou *erythrogenes*), d'autres, au contraire, exigent la présence dans les milieux de culture d'éléments hydrocarbonés, azotés et même inorganiques très variés. C'est ainsi que *B. roseus fluorescens* ensemencé sur gélose-peptone, donne des cultures achromogènes, sans caractères distinctifs particuliers. Au contraire, la culture de ce même germe en milieu synthétique L₁ ou L₂, permet de mettre en évidence sa fluorescence et son pigment rouge caractéristique.

Des travaux que nous avons déjà mentionnés, ont été effectués sur l'influence de divers composés hydrocarbonés ou azotés (I85, 336, 337) et des oligo-éléments (I84, 2I8) sur la chromogénèse bactérienne.

Nous ne signalerons ici que les observations que nous avons faites sur la chromogénèse de *B. roseus fluorescens*, cultivé sur divers milieux organiques.

I) INFLUENCE DE CERTAINS ACIDES ORGANIQUES SUR LA CHROMOGENESE DE B. ROSEUS FLUORESCENS

Nous avons ensemencé *B. roseus fluorescens* sur les milieux à base d'acides organiques qui nous ont servi à l'étude des acides aminés synthétisés par ce germe et dont nous avons donné la composition p.100.

Chaque essai était effectué sur de très nombreux tubes, la chromogénèse étant une manifestation essentiellement variable.

Résultats

B. roseus fluorescens n'est pas capable d'élaborer son pigment rouge caractéristique lorsqu'il est cultivé sur ces milieux où le carbone nécessaire est fourni par un seul acide organique, quel que soit cet acide (pyruvate, α cétooglutarate, citrate, succinate, malate et fumarate).

2) INFLUENCE DE DIVERSES SUBSTANCES HYDROCARBONÉES SUR LA CHROMOGENESE DE *B. ROSEUS FLUORESCENS* CULTIVE DANS LES MILIEUX A BASE D'ACIDES ORGANIQUES

LASSEUR et ses collaborateurs avaient étudié en 1942 (336), l'influence de quelques glucides sur la chromogénèse de *B. aurantiacus tingitanus*, *B. pyocyaneus pyocyanogenes*, *B. mesentericus niger* et *B. lactis niger* Gorini. De leurs expériences, ils avaient conclu que les besoins d'une bactérie pour la production de certains pigments variaient avec le pigment considéré et l'espèce bactérienne envisagée.

C'est pourquoi nous avons voulu étudier l'influence sur la chromogénèse de *B. roseus fluorescens*, de diverses substances hydrocarbonées associées aux acides organiques que nous avons déjà utilisés.

Pour cette étude, nous employions les mêmes milieux que précédemment auxquels nous incorporions les diverses substances hydrocarbonées que nous voulions étudier (concentration finale de 1 %).

A) une première série d'expériences porte uniquement sur l'influence de divers composés hydrocarbonés sur la production de pigment rouge en milieu de base additionné de pyruvate. Nous avons essayé en particulier, et à la concentration de 1%, les composés suivants:

la glycérine

divers pentoses : xylose
arabinose
ribose
rhamnose

divers hexoses : glucose
mannose
lévulose
galactose
sorbitose

divers diholosides: lactose
 maltose
 saccharose
un triholoside : raffinose

De tous ces composés hydrocarbonés, trois seulement permettent à *B. roseus fluorescens* d'élaborer son pigment rouge caractéristique:

- la glycérine
le pigment se forme après 3 à 4 jours de culture;
- deux hexoses: le glucose et le mannose
qui permettent l'apparition du pigment dès le 3^o jour.

B) Nous avons ensuite étudié l'influence de ces trois composés (glycérine, glucose et mannose en concentration finale de 1%) sur la chromogénèse de *B. roseus fluorescens* cultivé sur le milieu de base précédemment cité, en présence de l'un des acides organiques suivants:

acide oxaloacétique
acide α céto glutarique
acide succinique
acide malique
acide fumarique

Nous avons obtenu les résultats suivants:

a) influence de la glycérine

L'introduction de glycérine permet dans tous les cas à *B. roseus fluorescens* d'élaborer son pigment rouge après 3 à 5 jours de culture.

b) influence du glucose

L'incorporation de glucose dans les milieux à base d'oxaloacétate, de succinate, de malate et de fumarate, permet la formation du pigment rouge de ce germe, tandis qu'elle est sans action sur un milieu contenant de l'acide α céto glutarique.

c) influence du mannose

B. roseus fluorescens élabore son pigment si l'on incorpore du mannose dans la proportion de 1%, à des milieux contenant de l'oxaloacétate, du succinate, et du fumarate. Ce pigment apparaît dès le 5^o jour avec tous ces acides.

Par contre, le mannose n'a aucune influence sur la production du pigment en milieu à base de malate et d'α cétooglutarate.

D'après ces résultats, il est impossible d'établir une relation entre la structure du composé introduit, celle de l'acide organique et la formation de pigment par *B. roseus fluorescens*.

Nous voyons seulement que deux glucides de formule brute semblable mais épimères (glucose et mannose), n'ont pas la même influence sur la chromogénèse de *B. roseus fluorescens* en présence de malate.

3) INFLUENCE DES VARIATIONS DE COMPOSITION DU MILIEU L₂ SUR LA CHROMOGENESE DE B. ROSEUS FLUORESCENS

B. roseus fluorescens cultivé sur milieu L₂, produit son pigment caractéristique dès le 2^o ou 3^o jour, soit plus précocement qu'en milieu L₁ où le pigment ne se forme qu'après 4 ou 5 jours de culture.

Nous avons essayé de déterminer le rôle sur la chromogénèse de *B. roseus fluorescens*, des principaux composants du milieu L₂ (asparagine, glycérine, glucose, et succinate d'ammonium), tout en gardant les mêmes composants minéraux (phosphate dipotassique, ions Ca⁺⁺, Fe⁺⁺ et Mg⁺⁺). Nous avons donc réalisé le milieu de base suivant:

phosphate di-potassique	0,25 g
sulfate de magnésium	0,50 g
chlorure de calcium	0,04 g
sulfate ferreux	0,01 g
eau bidistillée	100 ml

auquel nous ajoutons de l'asparagine, de la glycérine, du glucose ou du succinate seuls ou associés, aux mêmes concentrations que dans le milieu L₂ normal.

La culture de *B. roseus fluorescens* sur ces différents milieux, nous a donné les résultats suivants:

		Croissance	
		sans pigment	avec pigment
I	Asparagine	+	
II	asparagine + glucose	+	
III	asparagine + glycérine	+	
IV	succinate	+	
V	asparagine + glucose + succinate		+
VI	asparagine + glycérine + succinate		+
VII	glucose + succinate		+
VIII	glycérine + succinate		+
IX	asparagine + succinate	+	
X	asparagine + glucose + glycérine = milieu L ₂ sans succinate		+
XI	glucose + glycérine + succinate = milieu L ₂ sans asparagine		+
XII	asparagine + glucose + glycérine + succinate = milieu L ₂		+
XIII	glucose	pas de croissance	
XIV	glycérine	pas de croissance	
XV	glucose + glycérine	pas de croissance	

Nous n'avons obtenu aucun développement de *B. roseus fluorescens* dans un milieu ne contenant que du glucose ou de la glycérine, seuls ou associés. Ces substances ne fournissent en effet que le carbone et non l'azote nécessaire à la croissance de ce germe.

Si le succinate seul n'est pas suffisant pour permettre l'élaboration du pigment de *B. roseus fluorescens*, associé à la glycérine et au glucose, il favorise l'apparition de ce pigment; mais il n'est pas nécessaire, puisque ce dernier se forme très bien dans un milieu L₂ sans succinate.

En dehors de son rôle de substance apportant l'azote nécessaire, au développement de *B. roseus fluorescens*, l'asparagine ne semble pas influencer sur la chromogénèse, tandis que le glucose et la glycérine apparaissent bien comme substances favorisant l'élaboration du pigment.

Ces expériences nous montrent donc l'influence complexe jouée par diverses substances hydrocarbonées sur la chromogénèse bactérienne.

4) PIGMENT OBTENU EN MILIEU A BASE DE MALATE ET PYRUVATE

Parmi tous les milieux organiques essayés (milieu de base contenant outre du phosphate dipotassique et du chlorure d'ammonium, des ions Mg^{++} , Ca^{++} , et Fe^{++} , et auquel nous ajoutons 2% d'acide organique), un seul nous a permis de faire une observation intéressante.

Si l'on cultive en effet *B. roseus fluorescens* sur un milieu contenant 2% d'acide malique et additionné de 0,50% de pyruvate de sodium, on assiste après 4 à 5 jours de culture à 25°C, à la formation d'un pigment bleu.

Nous avons tout d'abord vérifié qu'il ne s'agissait pas d'une contamination, en pratiquant des isolements successifs et la culture en milieux synthétiques L₁ et L₂ des colonies isolées: toutes ces cultures donnaient naissance au pigment rouge caractéristique de *B. roseus fluorescens*.

a) Conditions d'apparition du pigment bleu

Le pigment bleu se forme dès le 4^e jour de culture à 25°C de *B. roseus fluorescens* en milieu malate à 2% additionné de 0,50% et 0,75% de pyruvate. Avec 0,25% de pyruvate, nous n'observons qu'une très faible et très fugace coloration bleue.

Si la culture a lieu en fiole d'Erlenmeyer, tout le milieu de culture se colore en bleu, alors qu'en tube, il se forme un anneau bleu dans le tiers supérieur du tube, anneau devenant plus important après 8 jours de culture.

Après 15 jours de culture aussi bien dans les tubes

que dans les fioles d'Erlenmeyers, le pigment disparaît de lui-même ou sous l'influence d'une légère agitation.

Il semble donc que le meilleur moment pour son étude se situe entre le 5^o et le 8^o jour de culture.

Le germe qui fournit ce pigment est une souche de *B. roseus fluorescens* en tout point semblable (morphologie, réactions biochimiques, production de pigment et de fluorescence en L₁ ou en L₂) au bacille normal. De plus, cultivé en milieu malate et pyruvate, il est toujours capable, même après de nombreux passages sur ce milieu, de reproduire en milieux L₁ ou L₂, son pigment rose et sa fluorescence caractéristiques.

b) Propriétés du pigment bleu

Une culture bien colorée en bleu, âgée de 4 à 6 jours, est centrifugée. Même en opérant rapidement, et en remplissant les tubes au maximum, l'intensité du pigment diminue. Après avoir versé le liquide de centrifugation dans une fiole d'Erlenmeyer stérile, le pigment a disparu: nous n'avons plus qu'un liquide jaune.

Nous constatons donc que l'air décolore le pigment: c'est sur ce pigment décoloré par l'air que nous avons effectué quelques recherches qui nous ont permis de montrer:

- 1) que par action de la lumière diffuse et des rayons solaires, le pigment se recolore en bleu.
- 2) que les rayons ultra-violets peuvent agir sur le pigment. Il faut 10 minutes d'exposition à l'ultra-violet, pour obtenir la recoloration en bleu du pigment, placé dans une cuve en quartz, sous 1 à 2 mm d'épaisseur.
Après ce temps, l'exposition à l'air suffit pour le décolorer de nouveau, mais il faudra alors 20 minutes d'exposition à l'ultra-violet pour que ce pigment se recolore en bleu très faible.
- 3) que l'obscurité n'a aucune action sur la recoloration du pigment.
- 4) que l'hydrosulfite de sodium a une action sur le pigment décoloré.

Des traces d'hydrosulfite font réapparaître la coloration bleue du pigment, tandis qu'une quantité plus importante recolore le liquide en rose.

Conservés sous huile de vaseline, même après un mois, les pigments roses obtenus après action d'une grande quantité d'hydrosulfite, demeurent intacts s'ils sont restés à l'obscurité; ils sont légèrement atténués s'ils sont demeurés à la lumière.

Dans les mêmes conditions, les colorations obtenues par l'action de traces d'hydrosulfite, se sont atténuées.

Conservés sans huile de vaseline, les deux pigments sont décolorés au bout d'un mois.

- 5) que l'hydroquinone recoloré en rose le pigment décoloré.
- 6) que l'action de l'eau oxygénée à 20 volumes est variable. L'eau oxygénée n'a pas d'action sur le pigment décoloré, mais sur le pigment rose obtenu après une forte réduction, elle agit en le décolorant.

En résumé, les oxydants décolorent le pigment bleu, tandis que les réducteurs tendent à le recolorer en bleu, et même en rose, si leur action se manifeste plus fortement.

L'ultra-violet a une action se rapprochant de celle des réducteurs: nous savons en fait que le rayonnement ultra-violet est capable de détruire certaines substances oxydantes, par là-même, d'empêcher toute action ultérieure de ces substances. Annihilant le rôle de certains oxydants, l'ultra-violet peut faciliter jusqu'à un certain point, la recoloration du pigment en bleu.

c) Etude chromatographique du pigment

Si nous plongeons l'extrémité de bandes de papier Schleicher et Schull n° 2.403 A, de 4 cm de large, dans une culture colorée et centrifugée, et que nous laissons monter le pigment par capillarité, nous constatons, après 12 heures à la température du laboratoire, que le papier présente à sa partie supérieure:

- un mince liseré à reflets verdâtres,
- une zone rose-orangé, étroite et immédiatement inférieure.

La partie colorée du papier est soumise alors à l'action de l'ultra-violet: même après 30 minutes, nous n'observons aucune modification.

En découpant dans la partie supérieure du papier des carrés que nous immergeons dans divers solvants, nous avons vu que ce pigment est:

- très soluble dans l'eau froide
- très peu soluble dans l'alcool et l'éther
- insoluble dans le chloroforme.

L'action de l'ultra-violet pouvant s'expliquer par le fait que ce rayonnement détruirait une substance oxydante ou oxydée du milieu, (ce qui équivaldrait à une réduction), nous avons été conduite à examiner les différentes valeurs du rH dans les milieux où la pigmentation est différente.

Nous avons donc déterminé le rH de deux milieux et ses variations possibles:

- en milieu à base de malate et de pyruvate où le pigment est bleu,
- en milieu L_I où le pigment est rose.

Nous avons mesuré les rH au moyen d'un appareillage électrique (électrode de platine). Les cultures de *B. roseus fluorescens* en milieu contenant du malate et du pyruvate et en milieu L_I, étaient prélevées après 3 jours, 6 jours, 8 jours, 10 jours, 15 jours et 1 mois de séjour à 25°C et le rH mesuré directement dans ces cultures.

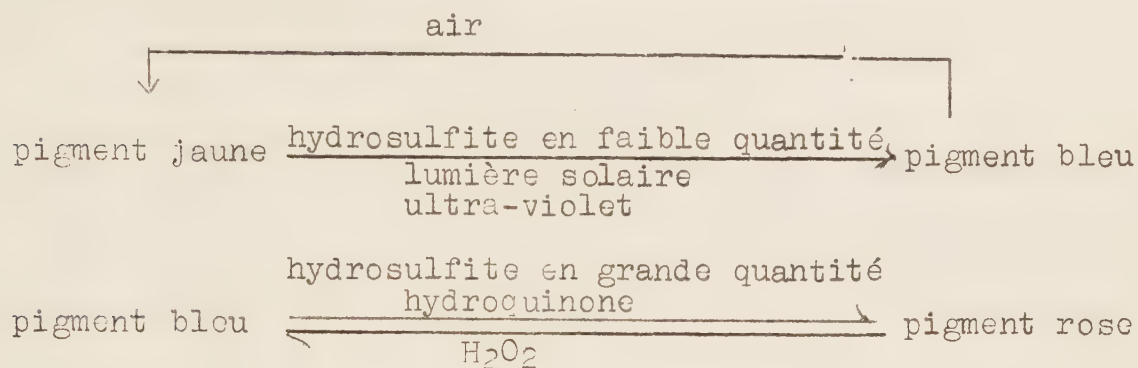
Nous avons obtenu les résultats suivants:

	valeurs mesurées du rH						
	rH initial	3j.	6j.	8j.	10j.	15j.	1 mois
L _I (pigment dès le 6 ^e jour)	15,6	22	30,6	32,6	30,6	26,6	23,2
malate + pyruvate 0,50% (pigment du 6 ^e au 10 ^e jour)	19	21,8	30,8	32	30,2	29	24,6

Il n'y a donc pratiquement aucune différence sensible dans les rH des milieux où nous observons un pigment rose ou un pigment bleu.

En résumé, l'étude de ce pigment est très délicate du fait même de sa disparition immédiate, dès qu'il est en contact avec l'oxygène de l'air.

Cependant, dans l'état actuel de nos recherches et pour expliquer ses transformations successives, nous proposons le schéma suivant:



o
o o

- CONCLUSIONS GENERALES -

=====

Dans la 1^o PARTIE DE CE TRAVAIL, nous avons donné un résumé des principales méthodes utilisées actuellement dans l'étude du métabolisme bactérien.

Nous nous sommes plus particulièrement étendue sur l'application de la chromatographie et de l'électrophorèse sur papier. Ces procédés, d'utilisation relativement simple, permettent la mise en évidence de produits divers, élaborés par les microorganismes durant leurs métabolismes.

La 2^o PARTIE DE CE TRAVAIL est consacrée à l'étude de quelques points du métabolisme azoté et carboné de *B. roseus fluorescens* J.G. MARCHAL, 1937.

Dans le chapitre I, nous nous sommes arrêtée à l'étude de l'utilisation de quelques acides aminés par *B. roseus fluorescens*.

1^o ce germe est capable de se développer en présence de divers acides aminés, fournissant à la fois le carbone et l'azote nécessaires.

Il n'y a pas de relation entre la structure d'un amino-acide et sa rapidité d'utilisation par ce germe (pour sa croissance): la longueur de la chaîne unie au groupement aminé n'influe pas sur son développement.

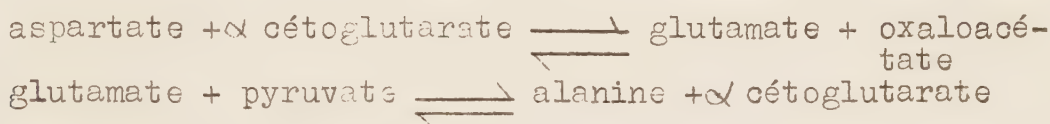
B. roseus fluorescens est capable d'assimiler des acides aminés de structure assez complexe (arginine, histidine, tryptophane), mais il n'utilise pas pour sa croissance la phénylalanine (acide aminé à noyau benzénique).

Les formes "l" des amino-acides incorporés ont en général une influence plus favorable que les formes "d" ou racémiques, à l'exception de l'alanine, dont la forme racémique favorise plus la croissance de *B. roseus fluorescens* que la forme "l".

2° B. roseus fluorescens désamine un grand nombre d'acides aminés. L'augmentation de la longueur de la chaîne unie au groupement aminé ainsi que la présence de radicaux sulfurés ou du noyau benzénique, diminuent le pouvoir de désamination de ce germe. Au contraire, l'existence d'une fonction acide supplémentaire (acides aspartique ou glutamique), ou d'une fonction alcool (sérine), du noyau indolique (tryptophane), imidazolique (histidine) et des résidus guanidiques de l'arginine, favorisent la désamination.

L'étude de l'action inhibitrice de l'arsénite de sodium sur ce métabolisme nous a permis de conclure à la présence d'acide-amino-déhydrases chez B. roseus fluorescens.

3° Nous avons pu établir que B. roseus fluorescens était capable de réaliser des réactions de transamination:



Non seulement ces 2 systèmes sont possibles, mais la transamination peut s'étendre chez ce germe à divers autres acides aminés.

Les réactions de transamination ne sont réellement très importantes qu'avec l'acide l-glutamique, l'acide l-aspartique et la l-alanine.

4° Nous avons pu enfin établir la dégradation par B. roseus fluorescens de la l-histidine en acide glutamique.

Dans le chapitre II, nous avons recherché les acides aminés formés par B. roseus fluorescens dans un milieu où les sources de carbone et d'azote étaient distinctes. Le carbone était fourni par un acide organique (acide di- ou tricarboxylique, acide cétonique), tandis que le chlorure d'ammonium fournissait l'azote nécessaire.

Nous avons utilisé la chromatographie et l'électrophorèse sur papier.

Les multiples expériences réalisées, nous ont permis de toujours retrouver deux acides aminés principaux,

l'alanine et l'acide glutamique, lorsque la source de carbone était fournie par l'acétate, le pyruvate, le citrate, l' α céto-glutarate et le succinate.

L'acide aspartique ne se retrouvait que si la source de carbone provenait de fumarate ou de malate.

Nous avons émis plusieurs hypothèses concernant la non-formation d'aspartate lorsque *B. roseus fluorescens* était cultivé sur des milieux ne contenant ni fumarate, ni malate. Nous rappellerons plus particulièrement 3 de ces hypothèses pour expliquer l'absence d'aspartate:

- 1) Il existerait une transamination totale entre l'aspartate et l' α céto-glutarate,
- 2) *B. roseus fluorescens* assimilerait cet amino-acide dès sa formation,
- 3) l'aspartate serait métabolisé par une voie rejoignant le cycle de l'urée.

La culture de *B. roseus fluorescens* dans un milieu à base de succinate ou d' α céto-glutarate, nous a permis de mettre en évidence la présence d'un acide aminé particulier: ses caractères chromatographiques et électrophorétiques le rapprochent de l'acide α amino-butérique, lequel proviendrait de la décarboxylation de l'acide glutamique par *B. roseus fluorescens*.

- Nous indiquons dans ce chapitre, des méthodes simples de préparation des acides oxaloacétique et α céto-glutarique.

Le chapitre III est consacré à l'étude du métabolisme de quelques acides organiques par *B. roseus fluorescens*: le carbone nécessaire provenait de l'acide organique lui-même, tandis que la source d'azote était fournie par du chlorure d'ammonium.

1° *B. roseus fluorescens* est capable de se multiplier en présence des divers acides organiques expérimentés (acétate, pyruvate, citrate, α céto-glutarate, succinate, malate et fumarate). Seul l'acétate ne permet pas un développement important de ce germe.

L'addition de pyruvate favorise la croissance de *B. roseus fluorescens* en milieu à base de succinate (concentration optima: 0,50%) ou de malate (concentration optima: 0,25 et 0,50%), mais n'a qu'un rôle relatif sur le développement de ce germe en présence de citrate.

L'incorporation d'acétate à un milieu à base de succinate, favorise la croissance du germe étudié (concentration optima: 0,2%), tandis que cette dernière se trouve gênée si le milieu contient du citrate.

2° L'étude de la respiration de *B. roseus fluorescens* en présence de ces acides organiques, nous a montré que ce germe était capable de les oxyder, mais à des taux variables.

Nous avons ensuite recherché l'influence de quelques inhibiteurs (malonate de sodium, fluorure de sodium, cyanure de potassium) sur cette respiration.

- (a) le malonate de sodium inhibe l'oxydation par *B. roseus fluorescens* du glucose, du pyruvate et du succinate.

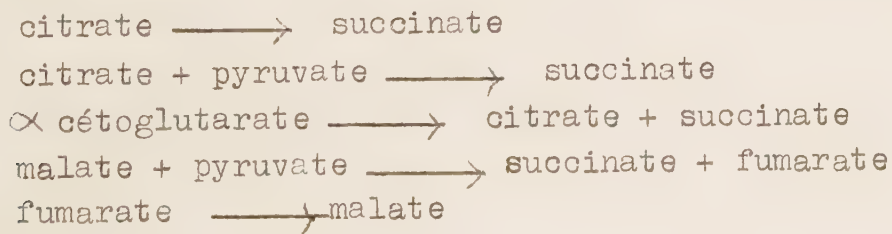
La dégradation du glucose et du pyruvate par ce germe passe donc par l'intermédiaire des acides en C₄.

- (b) l'inhibition de la respiration de ce germe par le fluorure de sodium, nous montre que *B. roseus fluorescens* possède une énolase.

- (c) l'oxydation du glucose, du succinate et du malate se fait par une voie enzymatique sensible au cyanure de potassium, tandis que celle du pyruvate peut s'effectuer par une voie insensible à cet inhibiteur.

B. roseus fluorescens possède des deshydrogénases très actives vis à vis du glucose, du pyruvate, du citrate et du succinate. La deshydrogénase malique est bien moins active.

3° La recherche des acides organiques libres des cultures de *B. roseus fluorescens* sur des milieux à base de ces composés, nous a permis de mettre en évidence que la dégradation du glucose passait par le stade pyruvate. Nous avons pu établir les transformations suivantes:



B. roseus fluorescens produit de l'acide α céto-glutarique à partir des composés suivants:

glucose
pyruvate
citrate
citrate + acétate
succinate
succinate + acétate
malate
fumarate
asparagine et glycérine (milieu L_I)

L'étude effectuée au chapitre IV sur la chromogénèse de B. roseus fluorescens, nous a montré que ce germe, cultivé sur un milieu à base d'un seul acide organique, n'est pas capable d'élaborer son pigment rouge caractéristique.

L'addition de glycérine, de glucose ou de mannose à ces milieux (dans la proportion de 1%) permet l'apparition de ce pigment.

Une remarque spéciale doit être faite sur le pigment bleu obtenu par culture de B. roseus fluorescens sur un milieu contenant à la fois du malate et du pyruvate.

La nature exacte de ce pigment éminemment instable, n'a pas encore pu être déterminée.

----- L'importance du cycle de l'acide citrique dans l'oxydation de l'acétate par les microorganismes a toujours été discutée.

Son existence peut être prouvée:

- en testant l'utilisation des intermédiaires de ce cycle par des "resting-cells"
- en recherchant l'action d'inhibiteurs, dont le malonate est le principal
- en étudiant les transformations successives des principaux intermédiaires, soit directement, soit en utilisant les éléments marqués.

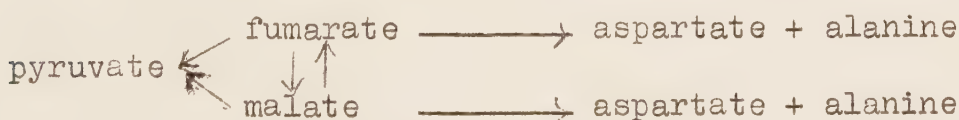
Nos études sur *B. roseus fluorescens* nous ont permis d'établir que ce germe était capable d'utiliser et d'oxyder les principaux acides organiques intermédiaires du cycle de KREBS, donc qu'il possédait les enzymes nécessaires à cette oxydation.

Le malonate inhibant l'oxydation du glucose, du pyruvate et du succinate, nous pouvons affirmer que l'oxydation de ces substrats par *B. roseus fluorescens* passe par les acides en C₄.

La formation des mêmes acides aminés (alanine, acide glutamique) à partir de pyruvate, citrate, α -cétooglutarate, succinate, montre que ces acides sont remplaçables l'un par l'autre dans ce métabolisme; la présence d'acide glutamique dans un milieu où l'acétate est la seule source de carbone, remet en question l'existence du cycle tricarboxylique.

La dégradation des acides organiques par *B. roseus fluorescens* et la formation d'autres acides à partir de ces mêmes composés, (succinate à partir de citrate, d' α -cétooglutarate; malate à partir de fumarate; production d' α -cétooglutarate à partir de tous les substrats essayés; de pyruvate à partir de succinate, malate et fumarate) ne s'opposent pas à l'existence possible d'un cycle tricarboxylique.

L'exception à ce mécanisme pourrait être constituée par le fumarate et le malate dont les transformations peuvent se résumer ainsi:



Ces 2 corps retrouvent cependant le cycle citrique grâce à la formation de pyruvate, et leur utilisation aboutit également à la formation d' α -cétooglutarate.

Toute conclusion définitive quant à l'existence possible d'un cycle tricarboxylique chez *B. roseus fluorescens* ne peut être donnée. Nous n'avons pu apporter la dernière preuve de ce mécanisme, du fait qu'il nous a été malheureusement impossible d'étudier l'incorporation d'éléments marqués.

On sait, de plus, que chez les Bactéries, la coexis-

tence de plusieurs cycles dans leurs métabolismes, n'est pas à rejeter.

Il nous apparaît d'après nos résultats, qu'un mécanisme semblable au cycle citrique existerait chez *B. roseus fluorescens*: la présence constante d' α céto-glutarate et surtout son élaboration à partir du succinate, nous feraient penser à la possibilité d'un blocage partiel au stade α céto-glutarate.

o
o o

- B I B L I O G R A P H I E -
=====

- (I) WEIL (H.), WILLIAMS (T.I.).- History of chromatography.
Nature, 1950, 166, 1000.
- (2) DAY (D.T.).- The variation in the character of Pennsylvania and Ohio
crude oils.
Industrial and Petroleum Rev. 1900, 3, suppl.25.
Proc. Amer. Phil. Soc. 1897, 36, 112.
- (3) MACHEBOEUF (M.), MUNIER (R.), ALLOUF (R.).- La chromatographie sur
papier.
in: Techniques de Laboratoire. Masson, Ed. 1954, p.344.
- (4) CONSDEN (R.), GORDON (A.H.), MARTIN (A.J.P.).- Qualitative analysis
of proteins: a partition chromatographic method using paper.
Biochem. J. 1944, 38, 224.
- (5) MEUNIER (P.).- Analyse chromatographique.
in: Techniques de Laboratoire. Masson, Ed. 1954, p.329.
- (6) WILSON.- J. Am. Chem. Soc. 1940; 62, 1583.
- (7) MARTIN (A.J.P.), SYNGE (R.L.M.).- A new form of chromatogram employing
two liquid phases: 1) A theory of chromatography; 2) application
to the microdetermination of the higher monoaminoacids in proteins.
Biochem. J. 1941, 35, 1358.
- (8) WEISS.- J. Chem. Soc. 1943, 297 et 303.
- (9) TISELIUS (A.).- Kolloid Zeit. 1943, 105, 101, 109.
- (10) HIGGINS (L.F.), FIELD (J.).- Adsorption mechanisms.
Science, 1926, 63, 454.
- (11) PROOM (H.), WOIWOD (A.J.).- Chem. Industr. G.B. 1953, 14, 311.
- (12) MACHEBOEUF (M.).- Microchromatographie sur papier.
Bull.Ass.Dipl. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1953, 50, 4.
- (13) ISHERWOOD (F.A.), JERMYN (M.A.).- Relationship between the structure
of the simple sugars and their behaviour on the paper chromatograms.
Biochem. J. 1951, 48, 515.
- (14) WILLIAMS (R.J.), KIRBY (H.).- Paper chromatography using capillary
ascent.
Science, 1948, 107, 481.
- (15) CONSDEN (R.), MARTIN (A.J.P.), SYNGE (R.L.).- Biochem. J. 1944, 38, 65.

- (16) BOISSONAS (R.A.).-- Séparation rapide des acides aminés par chromatographie ascendante bidimensionnelle sur papier.
Helv. chim. acta. 1950, 33, 1966.
- (17) CRUICKER (H.R.), DENT (C.E.).-- Distinctive test for alpha-aminoacids in paper chromatography.
Nature, 1949, 164, 441.
- (18) GIDDEY (C.).-- Journal suisse de Médecine. 1953, N° 14, 331.
- (19) DENT (C.E.).-- A study of the behaviour of some sixty aminoacids and other ninhydrin-reacting substances on phenol-collidine filter paper chromatograms, with notes as to the occurrence of some of them in biological fluids.
Biochem. J. 1948, 43, 169.
- (20) POWDEN (L.).-- Biochem J. 1952, 50, 355.
- (21) KOWKABASSY (G.N.), CASSIDY (H.G.).-- Investigation of paper chromatography. Factors that may affect Rf values in paper chromatography.
Anal. Chem. 1952, 24, 643.
- (22) PENEAU (H.), SAÏDS (E.), ANDRETTI (C.).-- Chromatographie sur papier de l'histamine: application à la recherche et au dosage de cette base dans les milieux de culture de Streptomyces et dans les sels de streptomycine.
Ann. Pharm. Fr. 1952, 10, 514.
- (23) OVERELL (B.T.).-- Austral. J. Sc. 1952, 15, 28.
- (24) MULLER (R.H.).-- Anal. Chem. 1951, 23, 396.
- (25) RUTTER (L.).-- A modified technique in filter paper chromatography.
Nature, 1948, 161, 435.
- (26) LUDERITZ (O.), WESTPHAL (U.).-- Über die Chromatographie und Rundfiltern.
Z. Naturforschg. 1952, 7b, 136.
- (27) ZIMMERMANN (G.), NEHRING (K.).-- Über Ring-Papierchromatographie nach der Tropfmethode.
Angew. Chem. 1951, 63, 556.
- (28) GIRI (K.V.).-- Curr. Sc. 1951, 20, 295.
- (29) GIRI (K.V.), NAN RAO.-- Circular paper chromatography: I) A technique for the separation and identification of aminoacids.
J. Indian Instr. Sc. 1952, 34, 95.
Nature, 1952, 169, 923.
- (30) GIRI (K.V.), RADHAKRISHNAN (A.N.), VAIDYANATHAN (C.S.).-- A simple paper chromatographic method for the study of transamination reactions.
Nature, 1952, 170, 1025.

- (31) TARA RAO, GIRI (K.V.).-- Circular paper chromatography: the separation, identification and quantitative determination of urea, with application to human urine.
J. Indian Instr. Sc. Sect. A. 1953, 35, 137.
Bull. Analytique, 14, 137, 798.
- (32) CRAMER (F.).-- Paper chromatography.
Mac Millan and Co Ltd. London, 1954, p.47.
- (33) MUNIER (R.), MACHEBOEUF (M.), CHERRIER (N.).-- Microchromatographie des alcaloïdes et des bases azotées biologiques sur papier traité préalablement par des sels. I) Essais préliminaires sur les papiers phosphatés - II) Amélioration de la technique des phases solvantes acides.- Utilisation de papier imprégné par un sel dont l'anion est celui de l'acide qui acidifie la phase solvante.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 1919.
1952, 35, 204.
- (34) SAVARY (P.).-- Contribution à l'étude de la chromatographie sur papier des acides gras.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 36, 927.
- (35) HAGDAH (L.), TISELIUS (A.).-- Salting out chromatography of aminoacids and peptides in filter paper and other media.
Nature, 1952, 170, 799.
- (36) CRAMER (F.).-- Paper chromatography.
Mac Millan and Co Ltd. London, 1954.
- (37) CAVALLINI (D.), FRONTALI (N.), TOSCHI (G.).-- Determination of ketoacids by partition chromatography on filter paper.
Nature, 1949, 163, 568.
164, 792.
- (38) MUNIER (R.), MACHEBOEUF (M.).-- Microchromatographie de partage des alcaloïdes et de diverses bases azotées biologiques.
Bull. Soc. Chim. biol. 1949, 31, 1144.
1950, 32, 192
1951, 33, 846 et 857.
- (39) SANGER (F.).-- Biochem. J. 1943, 37, 92.
1944, 38, 285
1945, 39, 351 et 507.
1946, 40, 261.
- (40) SANGER (F.).-- Species differences in insulin.
Nature, 1949, 164, 529.
- (41) SANGER (F.), TUPPY (H.).-- The aminoacid sequence in the phenylalanine chain of insulin.
Biochem. J. 1951, 49, 463 et 481.

- (42) CONSDEN (R.), GORDON (A.H.), MARTIN (A.J.P.).- The identification of lower peptides in complex mixtures.
Biochem. J. 1947, 41, 590.
- (43) SYNGE (R.L.M.).- A further study of hydrolysates of gramicidin.
Biochem. J. 1949, 44, 542.
- (44) HARRIS (J.), WORK (T.S.).- The synthesis of peptides related to gramicidin S and the significance of optical configuration in antibiotic peptides.
Biochem. J. 1950, 46, 582.
- (45) CONSDEN (R.), GORDON (A.H.), MARTIN (A.J.P.).- The identification of aminoacids derived from cystine in chemically modified wool.
Biochem. J. 1946, 40, 580.
- (46) ZAHN (H.).- Veränderungen der Wolle durch chemische und thermische Wirkungen.
Melliands Textilber, 1950, 31, 481.
- (47) FELIX (K.), FISCHER (H.), KREKELS (A.), RAUEN (H.M.).- Über Clupein.
Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 1950, 286, 67.
- (48) WIELAND (Th.).- Liebigs Ann. Chem. 1949, 564, 152.
- (49) SIMONART (P.), KWANG YU CHOW.- Etude du métabolisme des acides aminés chez *Aspergillus orizae*. Influence du pH sur la teneur en acides aminés libres d'*Aspergillus orizae* cultivé sur "casamino-acids" et sur acide glutamique.
Ant. Van Leeuwenhoeck. 1953, 19, 121.
- (50) DAGLAY (S.), DAWES (E.A.), MORRISON (G.A.).- Production of aminoacids in synthetic media by *E.Coli* and *Aerobacter aerogenes*.
Nature, 1950, 165, 437.
- (51) FRATEUR (J.), SIMONART (P.), COULON (T.).- Etude chromatographique de cultures d'*Acetobacter*.
Ant. Van Leeuwenhoeck. 1954, 20, 111.
- (52) TIBALDI (E.).- La cromatografia su carta nello studio della biochimica batterica: ricerche sugli aminoacidi di un ceppo di *Hemophilus paraptussis*.
Nuovi Ann. Ig. Microbiol. Ital. 1953, 4, 128.
- (53) TIBALDI (E.), TOZZOLA (G.).- Nuovi Ann. Ig. Microbiol. Ital. 1952, 3, 449.
- (54) MASON (M.), BERG (C.P.).- A chromatographic method for the detection of tryptophan metabolites.
J. Biol. Chem. 1951, 188, 783.

- (55) DAVIS (B.D.).- Symposium sur le métabolisme microbien.
2° Congrès international de biochimie 1952.
- (56) DAVIS (B.D.).- Diaminopimélic acid and lysine; biosynthetic inter-
relations of lysine, diaminopimelic acid and threonine in mutants
of E.Coli.
Nature, 1952, 169, 534.
- (57) TONHAZY (N.E.), PELCZAR (H.J.).- J. of Bacteriology, 1953, 65, 368.
- (58) WARBURTON (R.H.), EAGLES (B.A.), CAMPBELL (J.J.R.).- Canad. J. Bot.
1951, 29, 143.
- (59) KOEPESELL (A.J.), STODOLA (F.H.), SHARPE (S.S.).- Production of alpha-
cetoglutarate in glucose oxidation by Pseudomonas fluorescens.
J. Am. Chem. Soc. 1952, 74, 5142.
- (60) HOCKENHULL (D.J.D.), WILKIN (G.D.), WINDER (F.G.).- Production of
ketoglutarate by Penicillium chrysogenum.
Nature, 1951, 168, 1042.
- (61) HOUSEWRIGHT (R.D.), THORNE (C.B.).- Synthesis of glutamic acid and
glutamyl-polypeptide by B.anthraxis. I) Formation of glutamic
acid by transamination.
J. of Bacteriology, 1950, 60, 89.
- (62) ROWSELL (E.V.).- Transamination to pyruvate and some other alpha-
ketoacids.
Nature, 1951, 168, 104.
- (63) WOIWOD (A.J.), PROOM (H.).- J. Gen. Microbiol. 1950, 4, 501.
- (64) WORK (E.).- The isolation of alpha-epsilon-diaminopimelic acid from
C.diphtheriae and M. tuberculosis.
Bioch. J. 1951, 49, 17.
J.Gen. Microbiol. 1953, 9, 394.
- (65) BLASS (J.), LECOMTE (O.), MACHEBOEUF (M.).- Recherches sur les amino-
acides libres de Vibrio cholerae par microchromatographie.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 1553.
- (66) WOIWOD (A.J.), PROOM (H.).- J. Gen. Microbiol. 1951, 5, 830.
- (67) BUTIAUX (R.), OSTEUX (R.), FRESNOY (R.), MORIANEZ (J.).- Ann. Inst.
Pasteur. Fr. 1954, 87, 375.
- (68) FORSYTH (W.G.C.).- Application à la microbiologie de la technique
de chromatographie sur papier.
Chem. Industr. G.B. 1953, 14, 315.
- (69) WORK (E.).- Chromatographic investigations of aminoacids from micro-
organisms; II) Isolation of two unknown substances from
C. diphtheriae.
Biochim. Biophysic. Acta, 1950, 5, 204.

- (70) REED.- The occurrence of gamma-aminobutyric acid in yeast extract. its isolation and identification.
J. Biol. Chem. 1950, 183, 451.
- (71) BURSTALL (F.H.), DAVIES (G.P.), LINSTAEDT (R.P.), WELLS (R.A.).- Inorganic chromatography on cellulose II) the separation and detection of metals and acid radicals on strips of adsorbent paper.
J. Chem. Soc. G.B. 1950. 516.
- (72) TISELIUS (A.), DRAKE (B.), HAGDAHL (L.).- Experientia, 1947, 3, 21.
- (73) CONSDEN (R.), GORDON (A.H.), MARTIN (A.J.P.).- J.Biol. Chem. 1948, 42, 443.
- (74) CANNAN (A.K.).- J. Biol. Chem. 1944, 152, 401.
- (75) CONSDEN (R.), GORDON (A.H.).- Effect of salt on partition chromatography.
Nature 1948, 162, 180.
- (76) CONSDEN (R.), GORDON (A.H.), MARTIN (A.J.P.).- Biochem. J. 1947, 41, 580.
- (77) STEIN (W.H.), MOORE (S.).- Electrolytic desalting of aminoacids. Conversion of arginine to ornithine.
J. Biol. Chem. 1951, 190, 103.
- (78) PARTRIDGE (S.M.).- Biochem. J. 1949, 44, 418.
- (79) BOULANGER (P.), BISERTI (G.).- Chromatographie sur papier des acides aminés et polypeptides des liquides biologiques. II) Modifications techniques et résultats nouveaux (plasma sanguin).
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 1930.
- (80) SCRIBAN (R.).- Thèse Lille, Morel et Cordirant, 1951, p.23.
- (81) MACHEBOEUF (M.), CACHIN (M.), BLASS (J.).- Ann. Biol. Clin. 1952, 12, 22.
- (82) LISSITZKY (S.), CESAIRE (G.), MASSONET (R.).- Une technique simple d'extraction des acides aminés libres des liquides et extraits biologiques, en vue de leur séparation chromatographique.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 36, 655.
- (83) DENT (C.E.).- Biochem. J. 1949, 44, 324.
- (84) TABONE (J.), ROBERT (D.), THOMASSY (S.), NAMOUNAS (N.).- Microcaractérisation de la cynurénine en présence de tryptophane. Application à l'étude des hydrolysats alcalins de tryptophane.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1950, 32, 529.

- (85) PARTRIDGE (S.M.).- Filter paper partition chromatography of sugars.
I) General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and foetal blood of sheep.
Biochem. J. 1948, 42, 238.
- (86) WORK (E.).- Chromatographic investigations of aminoacids from micro-organisms I) The aminoacids of Coryn. diphteriae.
Biochim. Biophys. Acta, 1949, 3, 400.
- (87) NOVELLIE (L.).- A simple application technique for paper chromatography.
Nature, 1952, 169, 672.
- (88) YANOWSKI (C.), WASSERMAN (E.), BONNER (D.M.).- Large scale paper chromatography.
Science, 1950, 111, 61.
- (89) HEDEN (C.G.).- A method for large scale separation of aminoacids on filter paper.
Nature, 1950, 166, 999.
- (90) WIGGINS (L.F.), WILLIAMS (J.H.).- Use of n-butanol, formic acid, water mixture in the paper chromatography of aminoacids and sugars.
Nature, 1952, 170, 279.
- (91) WIELAND (Th.).- Chem. Ber. 1949, 82, 468.
- (92) DRAPER (O.), POLLARD (W.).- Purification of phenol for paper partition chromatography.
Science 1944, 109, 448.
- (93) MAC FARREN (E.F.).- Buffered filter paper chromatography of aminoacids.
Anal. Chem. 1951, 23, 168.
- (94) BOISSONAS (R.A.).- Révélation ponctuelle des acides aminés, des polypeptides et des sucres, séparés par chromatographie sur papier.
Helv. Chim. Acta, 1950, 33, 1972.
- (95) ZAHN (H.).- Mellliands Textilber, 1950, 31, 481 (voir Réf.46).
- (96) WOIWOD (A.J.), LINGGOOD (F.V.).- Aminoacid constitution of diphteria toxin and toxoid.
Nature, 1949, 163, 218.
- (97) PHILIPS (D.M.).- Use of ultra-violet fluorescence in paper chromatography.
Nature, 1948, 161, 53.
- (98) JOHANSEN (G.), NICKERSON (W.J.).- The reaction of aminoacids with reducing sugars.
Proc. 1st Inter.Cong. Biochem. Cambridge, 1948, 223.

- (99) GRAHAM, MAC GINNIS.- Science, 1949, 110, 217.
- (100) WOIWOD (A.J.).- Fluorescence of aminoacids, peptides and amines on the filter paper.
Nature 1950, 166, 272.
- (101) PATTON (A.R.), FOREMAN (E.), WILSON (P.C.).- Do aminoacids fluoresce on papergrams?
Science, 1949, 110, 593.
- (102) PATTON (A.R.), CHISM (P.).- Paper chromatography of browning reaction fluorogens.
Nature, 1951, 167, 406.
- (103) TOENNIES (G.), KOLB (J.J.).- Techniques and reagents for paper chromatography.
Anal. Chem. 1951, 23, 823 et 1095.
- (104) WOIWOD (A.J.).- A technique for examining large number of bacterial culture filtrates by paper chromatography.
J. Gen. Microbiol. 1949, 3, 312.
- (105) ACHER (R.), FROMAGEOT (C.), JUTISZ (M.).- Les acides aminés individuels de l'insuline avec une note sur le dosage de la proline.
Biochim. Biophys. Acta, 1950, 5, 81.
- (106) GRASMAN, ARNIM.- Ann. 1934, 509, 288.
1935, 519, 192.
- (107) BLOCK (R.J.).- Estimation of aminoacids and amines on paper chromatograms.
Anal. Chem. 1950, 22, 1327.
- (108) SAIFER (A.), ORESKES (I.).- L'isatine comme réactif colorant de révélation des acides aminés.
Science, 1954, 124, 3082.
- (109) DALGLIESH (C.E.).- Permanganate as a spraying reagent for aminoacids on paper chromatograms.
Nature, 1950, 166, 1076.
- (110) TALBONE (J.), ROBERT (D.), TROESTLER (J.).- Application de la chromatographie sur papier à l'analyse des arylamines biologiques.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1948, 30, 547.
- (111) CURZON (G.), GILTROW (J.).- Un réactif coloré pour l'analyse chromatographique d'un groupe d'acides aminés.
Nature, 1953, 172, 356.
- (112) REINDEL (F.), HOPPE (W.).- Sur une nouvelle méthode de coloration pour la mise en évidence de diverses substances sur des chromatogrammes sur papier et des électrogrammes.
Naturwissenschaften, 1953, 40, 221.

- (II3) ACHER (R.), CROCKER (C.).- Réactions colorées spécifiques de l'arginine et de la tyrosine réalisées après chromatographie sur papier.
Biochim. Biophys. Acta, 1952, 2, 704.
- (II4) CHARGAFF (E.), LEVERNE (C.), GREN (C.).- J. Biol. Chem. 1948, 175, 67.
- (II5) KAWERAN (E.), WIELAND (Th.).- Conservation of aminoacid chromatograms.
Nature, 1951, 168, 77.
- (II6) BLASS (J.).- Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 36, 627.
- (II7) MONDOLFO (U.), CAMBONI (V.).-Recherches sur la répartition de quelques acides aminés. Le dosage des acides aminés par les méthodes microbiologiques.
Boll. Ist. Sieroterap. milanese, 1949, 28, 332, in Bull. Analyt. 12, 100113.
- (II8) POLSON (A.).- Quantitative partition chromatography and composition of E.coli.
Biochim. Biophys. Acta, 1948, 2, 575.
- (II9) FISHER (R.), PARSON (D.), MORRISSON (G.).- Quantitative paper chromatography.
Nature, 1948, 161, 764.
- (I20) BRIMLEY (R.C.).- Quantitative paper chromatography.
Nature, 1949, 163, 215.
- (I21) NAFTALIN (L.).- Quantitative chromatographic estimation of alpha-aminoacids.
Nature, 1948, 161, 763.
- (I22) POLONOVSKI (M.), PENARANDA (F.), ROBERT (L.).- Etude critique d'une méthode de dosage des acides aminés par chromatographie sur papier.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1953, 35, 801.
- (I23) MOORE (S.), STEIN (W.H.).- Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of aminoacids.
J. Biol. Chem. 1948, 176, 367.
- (I24) POLSON (A.).- Biochim. Biophys. Acta, 1948, 2, 282.
- (I25) AWAPARA (J.).- Application of paper chromatography to the estimation of some free aminoacids in tissue of the rat.
J. Biol. Chem. 1949, 178, 113.
- (I26) BOISSONAS (R.A.).- Helv. Chim. Acta, 1950, 33, 1975.
- (I27) WOIWOD (A.J.).- A method for the estimation of micro amounts of amino-nitrogen and its application to paper partition chromatography.
Biochem. J. 1949, 45, 412.

- (I28) LANDUCCI (J.M.), PIMONT(M.).- Sur le microdosage des acides aminés par la méthode de Woitwed. Application aux spots chromatographiques.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1953, 35, 1041.
- (I29) MARTIN (A.J.P.), MITTELMANN (R.).- Quantitative microanalysis of aminoacid mixtures on paper partition chromatograms.
Biochem. J. 1948, 43, 353.
- (I30) KLATZKIN (C.).- Quantitative determination of aminoacids separated by paper partition chromatography.
Nature, 1952, 169, 422.
- (I31) KENTON (A.S.), UNDEFRIED (S.), LEVY (M.).- Paper chromatography applied to the isotopic derivative method of analysis.
Determination of organic compounds as isotopic derivatives.
II) Amino-acids by paper chromatography and indicator technique.
J.Am. Chem. Soc. 1947, 69, 3151.
1950, 72, 748.
- (I32) DENT (C.E.).- Biochem. J. 1948, 43, 169.
- (I33) VAN HALTEREN (M.B.).- Artefacts in the chromatography of mixtures of aminoacids containing cystein.
Nature, 1951, 168, 1090.
- (I34) CAVALLINI (D.), FRONTALI (N.), TOSCHI (G.).- Ketoacid content of human blood and urine.
Nature, 1949, 164, 792.
- (I35) ROVERY (M.), FABRE (C.).- Chromatographie sur papier en phase aqueuse pour l'étude des dinitrophénylaminoacides et peptides.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1953, 35, 541.
- (I36) BLACKBURN (S.), LOWTHER (A.G.).- The separation of 2-4-dinitrophénylaminoacids on paper chromatograms.
Biochem. J. 1951, 48, 126.
1950, 46, XXVII.
- (I37) BLASS (J.), MACHEBOEUF (M.).- Quelques détails d'application de la méthode chromatographique des aminoacides de Consden, Gordon et Martin.
Ann. Inst. Pasteur, Fr. 1947, 73, 1053.
- (I38) SZENTI-GYÖRGYI (A.).- Z. Physiol. Chem. 1937, 249, 211.
- (I39) PATTE (F.).- Dosage sélectif de la vitamine B₁₂ par chromatographie ascendante. Dosage dans les liqueurs de culture de Streptomyces. Elimination des antibiotiques.
Ann. Pharm. Fr. 1953, 11, n° 1.37.

- (I40) MAIS (I.M.), MACEK (K.).- Papirova chromatographia.
Nakladatelstvi ceskoslovenske Akademie vèd. Prague, 1954.
- (I41) BENTLEY (H.R.), WHITEHEAD (J.K.).- Water-miscible solvents in the separation of aminoacids by paper chromatography.
Biochem. J. 1950, 46, 341.
- (I42) MARCHAL (J.G.), MITTWER (T.).- Modification apportée à la technique de chromatographie sur papier. Chromatographie en arc de cercle.
Compt. Rend. Soc. Biol. Fr. 1951, 145, 417.
- (I43) MARCHAL (J.G.), BENE (R.).- Modification à la méthode chromatographique en arc de cercle.
Trav. Lab.Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1953, 17, 187.
- (I44) ADAMS (B.A.), HOLMES (E.L.).- J. Soc. Chem. Ind. 1935, 54, 9.
- (I45) GAUS (R.).- U.S. Patent 1916, I. 195. 923 in: "Les échangeurs d'ions".
Ann. Pharm. Fr. 1953; 11. 696 (voir Réf. n° 307).
- (I46) GRIESSBACH (R.).- Melliland Textilber, 1939, 20, 577.
- (I47) BLOCK (R.J.).- Proc. Soc. exp. biol. and med. 1942, 51, 252.
Federation Proc. 1946, 5, 123.
Arch. Biochem. 1946, 11, 235.
- (I48) PARTRIDGE (S.M.), BRIMLEY (R.C.).- Biochem. J. 1950, 46, 334.
- (I49) ARCHIBALD (R.M.).- J. Biol. Chem. 1945, 159, 693.
- (I50) CLEAVER (C.S.), HARDY (R.A.), CASSIDY (H.G.).- J. Am. Chem. Soc. 1945, 67, 1343.
- (I51) TURBA (F.), RICHTER (F.), KUCHNAR (F.).- Naturwissenschaften 1943, 31, 508.
- (I52) PARTRIDGE (S.M.).- Discuss. Faraday Soc. 1949, 7. 296.
- (I53) DAVIES (C.W.), HUGUES (R.P.), PARTRIDGE (S.M.).- Aminoacid separations by use of a strong base resin.
J. Chem. Soc. 1950, p.2285.
- (I54) MENTZER (C.H.), CRONENBERGER (L.).- Biochimie de la sève de merisier, Prunus avium.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1955, 37, 371.
- (I55) BEAUCHESNE (G.), NETIEN (G.).- Séparation des acides aminés d'un extrait de graines de maïs immatures à l'aide d'une résine synthétique et identification par chromatographie de partage sur papier.
Compt. Rend. Soc. Chim. Biol. 1952, 146, 1342.
- (I56) DURRUM (E.L.).- Electrophorèse en deux dimensions et ionophorèse.
J. Coll. Science, 1951, 6, 274.

- (I57) SANGER (F.).- The free amino-groups of insulin.
Biochem. J. 1945, 39, 507.
- (I58) MIDDLEBROOK (W.R.).- Hydroxylysine and lysine in wool.
Nature, 1949, 164, 321 et 501.
- (I59) SYNGE (R.L.M.).- A further study of hydrolysates of gramicidin.
Biochem. J. 1949, 44, 542.
- (I60) PARTRIDGE (S.M.), SWAIN (T.).- A reversed phase partition chromatogram using chlorinated rubber.
Nature, 1950, 166, 273.
- (I61) SANGER (F.).- - The free amino-groups in insulin.
Biochem. J. 1945, 39, 507.
- The free amino-groups of gramicidin "S"
Biochem. J. 1946, 40, 261.
- Biochem. J. 1949, 45, 563.
- (I62) PORTER (R.R.).- Use of 1-2-4-fluorodinitrobenzène in studies on proteins structure.
Biochim. Biophys. Acta. 1948, 2, 105—Biochem. J. 1950, 46, 305. Medical research. 1950, 3, 256.
- (I63) BISERTE (G.), OSTEUX (R.).- La chromatographie de partage sur papier des dinitrophénylaminoacides.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 50.
- (I64) ROVERY (M.), FABRE (C.).- Chromatographie sur papier en phase aqueuse pour l'étude des dinitrophénylaminoacides et peptides.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1953, 35, 541.
- (I65) WEIBULL (C.).- Les groupements aminés libres du protéide des flagelles de Proteus: dosage par chromatographie des acides aminés dinitrophénylés.
Acta chem. Scand. 1953, 7, n° 2.335.
- (I66) DARMON (P.), FAUCQUEMBERGUE (D.).- Une méthode optique de dosage des acides aminés après chromatographie sur papier.
Ann. Pharm. Fr. 1954, 12, 766.
- (I67) FOWDEN (L.), PENNEY (J.R.).- Estimation of losses in the quantitative estimation of amino-acids by paper chromatography.
Nature, 1950, 165, 846.
- (I68) WAEL (J.de), DIAZ CADAVIDECO (R.).- Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 1954, 73, n° 5.333.
- (I69) AGREN (G.), NILLSON (T.).- Acta chem. Scand. 1949, 3, 525.
Cité par Boulanger et Biserte: n° 79.

- (I70) RABINOVITZ (J.C.), SNELL (E.E.).- The vitamine B₆ group: microbiological activity and natural occurrence of pyridoxamine phosphate.
J. Biol. Chem. 1947, 169, 643.
- (I71) HOLDEN (J.T.), WILDMAN (R.B.), SNELL (E.E.).- Growth promotion by keto- and hydroxyacids and its relation to vitamine B₆
J. Biol. Chem. 1951, 191, 559.
- (I72) UMBREIT (W.W.), O'KRANE (D.J.), GUNSALUS (I.C.).- J.Biol. Chem. 1948, 176, 629.
- (I73) SNELL (E.E.).- A correlation of chemical, enzymatic, and growth-promoting proprieties of vitamine B₆.
Symposium de Microbiologie, 1952, Paris, Sedes, p.47.
- (I74) LICHSTEIN (H.C.), GUNSALUS (I.C.), UMBREIT (W.J.).- Rôle de la vitamine B₆ dans la transamination. Cité par Snell (I73).
- (I75) GUNSALUS (I.C.), BELLAMY (W.D.).- A function of pyridoxal. The function of pyridoxine derivatives in the decarboxylation of tyrosine.
J. Biol. Chem. 1944, 155, 357 et 557.
- (I76) UMBREIT (W.W.), GUNSALUS (I.C.).- J. Biol. Chem. 1945, 159, 333.
- (I77) BADDILEY (J.), GALE (E.F.).- Nature, 1945, 155, 727.
- (I78) UMBREIT (W.W.), WOOD (W.A.), GUNSALUS (I.C.).- J. Biol. Chem. 1946, 165, 731.
- (I79) WOOD (W.A.), GUNSALUS (I.C.), UMBREIT (W.W.).- J. Biol. Chem. 1947, 170, 313.
- (I80) AJL (S.J.), WONG (D.T.).- J. of Bacteriology, 1951, 61, 379.
- (I81) KREBS (E.), GURIN (S.), EGGLESTON (L.V.).- The pathway of oxidation of acetate in baker's yeast.
Biochem. J. 1952, 51, 614.
- (I82) SWIM (H.E.), KRAMPITZ (L.O.).- Acetic acid oxidation by E.coli: quantitative significance of the tricarboxylic acid cycle.
Feder. Proc. 1952, 11, 296.- J. of Bacteriology, 1954, 67, 426.
- (I83) STADTMAN (E.R.), STADTMAN (Th.).- Metabolism of microorganisms.
Ann. Rev. of Microbiology, 1953, 7, 143.
- (I84) MARCHAL (J.G.), CLAIRET (P.), DUPAIX-LASSEUR (A.).- Contribution à l'étude du rôle des éléments inorganiques dans le métabolisme bactérien: influence des oligo-éléments sur la chromogénèse.
Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1950, 17, 55.

- (I85) MARCHAL (J.G.), DUPAIX-LASSEUR (A.), GIRARD (Th).-- Contribution à l'étude de l'influence des acides aminés sur la chromogénèse bactérienne.
Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, 1948, 1949; I6, 24.
- (I86) MARCHAL (J.G.), MITTWER (T).-- Contribution à l'étude du métabolisme des acides aminés par les bactéries chromogènes: application de la méthode chromatographique sur papier.
Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, 1950, I7, 107.
- (I87) GODIN (P).-- Chromatographie des composants ternaires du mycelium de *Penicillium brevicompactum*.
Ant. van Leeuwenhoeck. 1954, 20, 321.
- (I88) SIMONART (P.), KWANG YU CHOW.--
- Etude du métabolisme d'acides aminés chez *Aspergillus orizae*.
Ant. Van Leeuwenhoeck., 1953, I9, 121.
- Acides aminés libérés dans le mycelium cultivé sur diverses sources de carbone, en présence d'ammoniaque.
Ant. Van Leeuwenhoeck, 1954, 20, 174.
- (I89) SIMONART (P.), DEKEYSER (L).-- Recherches sur la biochimie de *Penicillium Charlesii*. G. Smith.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 188.
- (I90) NIELSEN (N).-- Aminoacids in *Rhodotorula gracilis*.
Nature, 1949, I64, 1054.
- (I91) WORK (E).-- Les acides aminés de *Corynebacteriae*.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1949, 31, 138.
- (I92) LERCHE (C).-- Electrophorèse de *Micrococcus pyogenes aureus*.
Acta pathol. microbiol. Scand. 1953, suppl. n° 98, 194.
- (I93) BLASS (J.), LECOMTE (O.), MACHEBOEUF (M).-- Recherches sur les aminoacides libres de *Vibrio cholerae* par microchromatographie.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 1552.
- (I94) POLSON (A).-- New aminoacids in bacterial hydrolysates.
Nature, 1948, I61, 351.
- (I95) FROMAGEOT (Cl.), JUTISZ (M.), TESSIER (P).-- Evolution des acides aminés du corn steep au cours de la culture de *Penicillium chrysogenum*.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1949, 31, 689.
- (I96) MONDOLFO (H.), HOUNIE (E).-- Ricerche sugli aminoacidi della cellula batterica.
Boll. dell'Ist. Sero. mil. 1951, 30, 650.
- (I97) DAGLEY (S.), DAWES (E.A.), MORRISON (G.A).-- Production of aminoacids in synthetic media by *E.coli* and *Aerobacter aerogenes*.
Nature, 1950, I65, 437.

- (198) ABELSON (P.H.).- Biosynthèse des acides aminés chez E.coli.
J.Biol. Chem. 1954, 206, 335.
- (199) SENEZ (J.C.).- Métabolisme des acides aminés et des amides par les bactéries sulfato-réductrices.
Ann. Inst. Pasteur Fr. 1952, 83, 786.
- (200) KNOOP (F.), OSTERLIN (H.).- Ztschr.physiol. Chem. 1925, 148, 294.
- (201) EULER (H.V.), ADLER (E.), GUNTHER (G.), DAS (N.B.).- Ztschr.physiol. Chem. 1938, 254, 61.
- (202) DEWAN (J.G.).- Biochem. J. 1938, 254, 61.
- (203) RAYNAUD (M.), GROS (F.).- Etude sur la réaction de Stickland: Action inhibitrice du glucose, du pyruvate, et de la pénicilline.
Ann. Inst. Pasteur Fr. 1947, 73, 1003.
- (204) UMBREIT (W.W.), BURRIS (R.H.), STAUFFER (J.F.).- Manometric techniques and tissue metabolism.
Burgers Publishing Co. Mineeapolis, 1949.
- (205) MACHEBOEUF (M.), REYBEROTTE (P.), BRUNERIE (M.).-
-Applications aux sérums pathologiques, aux urines et aux liquides d'ascite de la méthode de microélectrophorèse sur papier.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 1543.
-Microélectrophorèse sur papier avec évaporation continue du solvant.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1953, 35, 334.
- (206) FRIEDMAN (T.E.), HAUGEN (G.E.).- Les acides cétoniques du sang et de l'urine humaine.
J. Biol. Chem. 1943, 147, 415.
- (207) CAVALLINI (D.), FRONTALI (N.).- Détermination quantitative des acides cétoniques par chromatographie sur papier.
Biochim. Biophys. Acta. 1954, 13, 439.
- (208) HAWARY (M.F.S.), THOMPSON (R.H.S.).- Separation and estimation of blood ketoacids by paper chromatography.
Biochem. J. 1953, 53, 340.
- (209) HAWARY (M.F.S.), THOMPSON (R.H.S.).- Identification par chromatographie des céto-acides chez des animaux empoisonnés avec de l'arsenic et de l'alloxane.
Biochem. J. 1954, 58, 518.
- (210) SELIGSON (D.), SHAPIRO (B.).- Les acides cétoniques dans le sang et dans l'urine: étude par chromatographie sur papier.
Anal. Chem. 1952, 24, 754.

- (211) METZLER (D.E.), SNELL (E.E.).- Deamination of serine.
J. Biol. Chem. 1952, 198, 363.
- (212) POUTEAU-THOUVENOT (M.).- La vitamine B₆ dans la biologie bactérienne.
Bull. Ass. Dipl. Microb. Fac. Pharm. Nancy, 1954, 57, 3.
- (213) LASSEUR (Ph.).- Contribution à l'étude de B. chlorographis G. et S.
Thèse Doctorat ès Sciences, Nancy, 1911.
- (214) LASSEUR (Ph.).- Compt. Rend. Soc. Biol. 1911, 70, 754.
1913, 74, 496.
- (215) LASSEUR (Ph.), THIRY (G.), DUPAIX (A.).- Le fer dans la vie microbienne.
Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, 1930, 3, 53.
- (216) LASSEUR (Ph.), VERNIER (P.).- Bull. Soc. Sci, 1924. Série 4, Tome 2., Fasc.2, p.69.
- (217) LASSEUR (Ph.), MARCHAL (J.G.), DUPAIX (A.), RENAUX (M.).- Observations sur la chromogénèse de B. cyaneofluorescens Zange-meister, 1895.
Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, 1932, 5, III.
- (218) ADAMS (R.A.).- Contribution à l'étude du métabolisme de B. roseus fluorescens: rôle de l'aliment inorganique dans la croissance et la chromogénèse.
Thèse Doct. Univ. Nancy Sciences, 1955.
- (219) LUGG (J.W.H.), OVERELL (B.T.).- One and two dimensional partition chromatography: separation of organic acids on an inert sheet support.
Nature 1948, 160.87-Australian J.Sci. Res. 1948, I, 98.
- (220) MUNIER (R.), MACHEBOEUF (M.).- Microchromatographie de partage des alcaloïdes et de diverses bases azotées biologiques.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1949, 31, II44.
1950, 32, 192.
1951, 33, 846 et 857, 862, 1919.
1952, 35, 204.
- (221) JERMSTAD (A.), JENSEN (K.B.).- Papierchromatographische Trennung und Identifizierung organischer Pflanzensäuren.
Pharm. Acta Helvetiae 1950, 25, 209.
- (222) CHEFTEL (R.), MUNIER (R.), MACHEBOEUF (M.).- Microchromatographie de partage sur papier des acides aliphatiques hydrosolubles et non volatils.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 840.
- (223) DENT (C.E.).- Paper chromatography and medecine.
in: Recent advances in clinical pathology. 2° édition.
Churchill éd.Londres, 1951.

- (224) ZENISEK (A.), KRAL (J.A.).- Biochim. Biophys. Acta, 1953, 12, 479.
- (225) KATZ (J.), CHAIKOFF (I.C.).- J. Biol. Chem. 1954, 206, 887.
- (226) BRYANT (F.), OVERELL (B.T.).- Displacement chromatography on ion exchange columns of the carboxylic acids in plant tissue extracts. Nature, 1951, 167, 361-Biochim. Biophys. Acta, 1953, 10, 471.
- (227) HULME (A.C.), SWAIN (T.).- Organic acids of the apple fruit. Nature, 1951, 168, 254.
- (228) HULME (A.C.).- An action of strongly basic anion exchange resins and solutions containing sugars. Nature, 1953, 171, 610.
- (229) PHILIPS (J.D.), POLLARD (A.).- Degradation of sugars on ion exchange columns of Amberlite, I R A 400. Nature, 1953, 171, 41.
- (230) NORDMANN (R.), GAUCHERY (O.), RUISSEAU (J.P. du), THOMAS (Y.), NORDMANN (J.).- Chromatographie sur papier des acides organiques non volatils des liquides biologiques: l'urine humaine. Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 36, 1461 et 1641.
- (231) MARTIUS (C.), NITZ-LITZOW (D.).- Chem. Ber. 1952, 85, 605.
- (232) VAS (K.).- La chromatographie des acides organiques. Acta Chim. Acad. Sci. Hungaricae 1951, 1, 335.
- (233) FEWSTER (M.E.), HALL (D.A.).- Nature, 1951, 168, 254.
- (234) SMITH (F.), SPRIESTERBACH (D.).- Nature 1954, 174, 466.
- (235) VAN DUUREN (A.J.).- Détermination des acides organiques des plantes par chromatographie sur papier. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 1953, 72, 889.
- (236) WIELAND (Th.), FISCHER (E.).- Papierchromatographie von alpha-Ketosäuren. Naturwissenschaften, 1949, 36, 219.
- (237) MOGASANIK (B.), UMBARGER (H.E.).- Séparation et identification des acides cétoniques par la chromatographie sur papier. J. Am. Chem. Soc. 1950, 72, 2308.
- (238) DAKIN (H.D.), DUDLEY (H.W.).- J. Biol. Chem. 1913, 15, 127.
- (239) BARRENSCHEEN (H.K.), DREGUSS (H.).- Biochem. Z. 1931, 233, 305.
- (240) CASE (E.M.).- Biochem J. 1932, 26, 753.
- (241) LU (G.D.).- Biochem. J. 1939, 33, 249.

- (242) SELIGSON (D.), SHAPIRO (B.).- La chromatographie sur papier des acides cétoniques du sang et de l'urine.
Anal. Chem. 1952, 24, 754.
- (243) TAUBER (H.).- La séparation des phénylhydrazones des acides cétoniques par électrophorèse sur papier et leur détermination colorimétrique.
Anal. Chem. 1955, 27, 287.
- (244) NEISH (W.J.P.).- On the separation of alpha-ketoacids dinitrophénylhydrazones by ionophoresis and their polarographic determination.
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 1953, 72, 105.
- (245) LE PAGE (G.A.).- Cancer research 1950, 10, 393.
- (246) YETM (E.W.), COCKING (E.C.).- Analyst. G.B. 1955, 80, 209.
- (247) FOWDEN (L.), PENNEY (J.R.).- Estimation of losses in the quantitative estimation of aminoacids by paper chromatography.
Nature, 1950, 165, 846.
- (248) MIYAMOTO, (H.), AKAMA (K.), MORITA (E.), IKEDA (T.).- Gunma
Gunma. J. med. sci. Jap. 1953, 2, 157.- Bull. Analytique:
15- 134569.
- (249) WISLICENUS.- Considérations sur l'ester oxalsuccinique.
Ber. 1889, 22, 885. Ann. 1895, 285, I.
- (250) WISLICENUS.- Recherches sur l'acide alpha-cétoglutarique.
Ber. 1911, 44, 1567.
- (251) BLAISE, GAULT.- Recherches sur les céto-diacides.
Compt.Rend. Ac. Sc. Fr. 1908, 147, 199.
- (252) GABRIEL.- Ber. 1909, 42, 655.
- (253) BLAISE, GAULT.- Bull.Soc. Chim. 1911, 9, 455.
- (254) INGOLD (C.K.).- Conditions de formation de composés organiques: produits dérivés de l'acide glutarique.
J. Chem. Soc. 1921, 119, 326 et 2001, 2014, 2019.
- (255) FRIEDMAN (L.), KOSOWER (E.).- Préparation de l'acide alpha-cétoglutarique.
Organic syntheses 1946, 26, 42.
- (256) NEEDHAM (D.M.).- Biochem. J. 1930, 24, 208.
- (257) COHEN (G.N.).- Biochem. J. 1939, 33, 1478.
- (258) COHEN (G.N.).- J. Biol. Chem. 1940, 136, 565.
- (259) CEDRANGOLO, CARADANTE.- Archiv. Sci. biol. 1941, 27, 106.

- (260) EULER et collaborateurs.- Ztschr. physiol. Chem. 1938, 255, 14.
- (261) LICHSTEIN (H.C.), COHEN (G.N.).- J. Biol. Chem. 1945, 157, 85.
- (262) MARCHAL (J.G.), GRANDJEAN-RADOWITCH (C.M.).- La transamination: étude chez *B. roseus* fluorescens.
Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, 1956, 18, sous presse.
- (263) BURRIS (R.H.).- Préparation de l'acide oxalo-acétique.
in: Manometric techniques and tissue metabolism. Burger's.
Publishing Co. USA. Minneapolis, p.211.
- (264) FENTON (H.J.H.), JONES (H.O.).- J. Chem. Soc. 1900, 77, 77.
- (265) MEYER (K.H.).- Formes énoliques de l'acide oxalo-acétique et de ses esters. Tautomérie.
Ber. 1912, 45, 2860.
- (266) GRIGNARD (V.).- in: Traité de Chimie organique. Tome II, fasc.2,
p.1413..
- (267) FENTON (J.H.), WILKS (V.A.).- Studies on certain aliphatic hydroxyacids.
J. Chem. Soc. 1912, 101, 1570.
- (268) MARCHAL (J.G.).- Sur une nouvelle bactérie chromogène des eaux:
B. roseus fluorescens n.sp. J.G. Marchal, 1937.
Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy, 1937, 10, 90.
- (269) AJL (S.J.).- Terminal respiration pattern in microorganisms.
Bact. Rev. 1951, 15, 211.
- (270) LICHSTEIN (H.C.).- Metabolism of microorganisms: Terminal respiration.
Ann. Rev. of Microbiology, 1952, 6, 1.
- (271) KARLSSON (J.L.), BARKER (H.A.).- Evidence against the occurrence of tricarboxylic acid cycle in *Azotobacter agilis*.
J. Biol. Chem. 1948, 175, 913.
- (272) CAMPBELL (J.J.R.), STOKES (F.N.).- Tricarboxylic acid cycle in *Pseudomonas aeruginosa*.
J. Biol. Chem. 1951, 190, 853.
- (273) BARRETT (J.T.), KALLIO (R.E.).- Terminal respiration in *Pseudomonas fluorescens*. Component enzymes of the tricarboxylic acid cycle.
J. of Bacteriology, 1953, 66, 517.
- (274) AJL (S.J.).- Acetic acid oxidation by *E. coli* and *Aerobacter aerogenes*.
J. of Bacteriology, 1950, 59, 499.
- (275) AJL (S.J.), KAMEN (M.D.).- Studies on the mechanism of acetate oxidation by bacteria.
Federation Proc. 1950, 9, 143.

- (276) AJL (S.J.).- Studies on the mechanism of acetate oxidation by bacteria. Evidence for the participation of fumarate, malate and oxal-acetate in the oxidation of acetate by E.coli.
J. Gen. Physiol. 1951, 34, 785.
- (277) AJL (S.J.), KAMEN (M.D.), RANSON (L.S.), WONG (D.T.O.).- Studies on the mechanism of acetate oxidation by Micrococcus lysodeikticus.
J. Biol. Chem. 1951, 184, 849 et 859.
- (278) BECK (E.S.), LINDSTROM (E.S.).- The oxidative metabolism of Bacillus cereus.
J. of Bacteriology, 1955, 70, 335.
- (279) CABELLI (V.J.).- The tricarboxylic acid cycle in the oxidative and synthetic metabolism of Klebsiella pneumoniae.
J. of Bacteriology, 1955, 70, 23.
- (280) GOPPELSROEDER.- Mémoire présenté à la Société industrielle de Mulhouse.
Séance du 30 octobre 1861.
Bull. Soc. Industr. de Mulhouse, Mars, 1862, II6.
- (281) LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.), MARCHAL (J.G.).- Fixation des colorants par les éléments microbiens: Analyse capillaire.
Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1933, 6, 36.
- (282) FINK (H.).- U.S.Patent, 2072.089.
- (283) LEDERER (E.).- Progrès récents de la chromatographie.
Hermann et C°, Ed. Paris, 1949.
- (284) LEDERER (M.).- Progrès récents de la chromatographie, 2° partie.
Hermann et C°, Ed. Paris, 1952.
- (285) TISELIUS (A.).- Ark. Kemi Mineral Geol. 1949, I4B, n°22
1941, I4B, n°32
I5B, n° 6
Advances in Protein. Chem. 1947, 3, 67.
- (286) TISELIUS (A.), CLAESON (S.).- Ark. Kemi Mineral Geol. 1942, I5 B,
N° 18.
- (287) LASSEUR (Ph.), MARCHAL (J.G.), MAGUITOT (C.).- Analyse capillaire et isolement des bactéries dans les mélanges bactériens.
Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1934, 7, 105.
- (288) SYNGE (R.L.M.).- Partition chromatography.
Analyst. 1946, 71, 256.
- (289) GORDON (A.H.), MARTIN (A.J.P.), SYNGE (R.L.M.).- Biochem. J. 1943,
37, a) p.79
b) p.92
c) p.312.

- (290) GORDON (A.H.), MARTIN (A.J.P.), SYNGE (R.L.M.).- Biochem J. 1944, 38, 65.
- (291) SYNGE (R.L.M.).- Analysis of a partial hydrolysate of gramicidin by partition chromatography with starch.
Biochem. J. 1944, 38, 285.
- (292) STEIN (W.H.), MOORE (S.).- Chromatography of aminoacids on starch columns.
J. Biol. Chem. 1948, 176, 357.
- (293) BARRY (G.T.), GREGORY (J.D.), CRAIG (L.C.).- Analyse des acides aminés de la bacitracine sur colonne d'amidon.
J. Biol. Chem. 1948, 175, 485
- (294) BORSOOK (H.), DEASY (C.L.), HAAGEN-SMIT (A.J.), KEIGHLEY (G.), LOWY (P.H.).- Séparation sur colonne d'amidon, d'acide glutamique et alpha aminoadipique.
J. Biol. Chem. 1948, 176, 1383.
- (295) WIELAND (T.), FREMERY (H.).- Ber. 1944, 77, 234.
- (296) ENGLIS (D.T.), FIESS (H.A.).- Ind. Eng. Chem. 1944, 36, 604, cité dans Lederer (283), p. 77.
- (297) FREUDENBERG (K.), WALCH (H.), MOLTER (H.).- Naturwissenschaften 1942, 30, 87, cité dans Lederer (283) p. 80.
- (298) GOODALL (R.R.), LEVI (A.A.).- A microchromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in a mixture.
Nature, 1946, 158, 675.
- (299) HORNE (R.E.), POLLARD (A.L.).- The identification of streptomycin on paperstripchromatograms.
J. Bacteriol. 1948, 55, 231.
- (300) ACHER (R.), JUTISZ (M.), FROMAGEOT (C.).- Biochim. Biophys. Acta, 1952, 8, 442.
- (301) CREMER (H.), TISELIUS (A.).- Biochem. Z. 1950, 320, 273.
- (302) KUNKEL (H.), TISELIUS (A.).- J. Gen. Physiol. 1951, 35, 89.
- (303) DURRUM (E.).- Une technique de microélectrophorèse et microionophorèse.
J. Am. Chem. Soc. 1950, 72, 2943.
- (304) TURBA (F.), ENENKEL (H.).- Naturwissenschaften 1950, 37, 93.
1951, 38, 189, cité dans F. Cramer: Paper chromatography. Mac Millan et Co, Ltd. London, 1954, p. 17.

- (305) SANTER (M.), AJL (S.J.).- Metabolic reactions of *Pasteurella pestis*.
I) Terminal oxidation.
J. of Bacteriology, 1954, 67, 17.
- (306) WAY (J.T.).- J. Roy. Agr. Engl. 1850, II, 313.
1852, 13, 123.
1855, 15, 491.
- (307) GANS (R.).- Jahrb. Kgl. preuss. geol. Landesanstalt, 1905, 26, 179.
1906, 27, 63,
cité dans: Les échangeurs d'ions: leurs applications en pharmacie.
J.Chabasse-Massoneau. Ann.Pharm. Fr. 1953, II, 696.
- (308) CASIDA (L.E.), KNIGHT (S.G.).- The oxidation of tricarboxylic acid cycle compounds by *Penicillium chrysogenum* ;
J. of Bacteriology, 1954, 67, 658.
- (309) GILMAN (C.M.), BUTTERWORTH (E.M.), NOBLE (E.P.).- Studies on the biochemistry of the *Streptomyces*. I) Terminal oxidative metabolism in *Streptomyces griseus*.
- (310) MONOD (J.).- Recherches sur la croissance des cultures bactériennes.
Hermann et C°. Ed. Paris, 1942.
- (311) CARLES (J.).- Nouvelle technique de chromatographie circulaire.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1955, 37, 521.
- (312) STRAIN.- J.Am. Chem. Soc. 1939, 61, 1292.
- (313) COOLIDGE.- J. Biol. Chem. 1939, 127, 551.
- (314) HAUGAARD (G.), KRONER (T.D.).- J. Am. Chem. Soc. 1948, 70, 2135.
- (315) BLASS (J.), LECOMTE (O.), POLONOVSKI (J.).- Sur une technique d'électrophorèse associée à la chromatographie sur papier, "chromatophorèse" appliquée aux amino-acides et bases aminées.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 36, 627.
- (316) POLONOVSKI (M.), BOULANGER (P.), L'ACHEBOEUF (M.), ROCHE (J.).-
"Biochimie Médicale", p.369, Masson Ed. Paris, 1952.
- (317) LWOFF (A.).- L'évolution physiologique.
Hermann et C°. Ed. Paris, 1943.
- (318) LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.), HOEUSLER (G.).- Aperçu sur la vie des microbes.
Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1942, 13, 33.
- (319) LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.), GAVOILLE (M.Th.).- Culture de différents types dissociés dans des milieux renfermant des amides ou des acides aminés comme source d'azote. Culture en milieu synthétique à base d'histidine ou de glycécolle.
Trav.Lab. Microbiol.Fac. Pharm. Nancy, 1942, 13, 63.

- (320) LASSEUR (Ph), DUPAIX-LASSEUR (A.), BONNEFOY (Ch.).- Culture de différents types dissociés de *Bacillus aurantiacus tingitanus* en milieu à base de tyrosine, histidine et cystine.
Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1942, 13, 98.
- (321) QUASTEL (J.H.), WOOLF (B.).- *Biochem. J.* 1926, 20, 545.
- (322) TABOR (H.), HAYAIKI (O.).- The enzymate conversion of histidine to glutamic acid.
J. Biol. Chem. 1952, 194, 171.
- (323) THUNBERG (T.).- *Skand. Arch. Physiol.* 1909, 22, 430. Cité par AUBEL (350)
- (324) QUASTEL (J.H.).- *Biochem. J.* 1926, 20, 166, cité par AUBEL (350).
- (325) QUASTEL (J.H.), WOOLBRIDGE (W.R.).- *Biochem. J.* 1928, 22, 689, cité par AUBEL (350).
- (326) KREBS (H.A.), EGGLESTON (L.V.).- *Biochem. J.* 1940, 34, 1386, cité par AUBEL (350).
- (327) EFFRONT (J.).- *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1890, 4, 337, cité par AUBEL (350)
- (328) MAC LEOD (J.).- *J. Biol. Chem.* 1913, 15, 497, cité par AUBEL (350)
- (329) EVANS (J.).- *J. Physiol.* 1922, 56, 146. Cité par AUBEL, (350).
- (330) LIPMANN (F.).- *Biochem. Z.* 1928, 196, 2. cité par AUBEL (350)
- (331) MEYERHOF (O.), LOHMANN (K.).- *Biochem. Z.* 1934, 271, 89.
273, 413, cité par
AUBEL (350)
- (332) BOREI (H.).- *Biochem. Z.* 1942, 312, 160, cité par AUBEL (350)
- (333) BATELLI, STERN.- *J. Physiol. et Path. gén.* 1907, 9, 228, cité par AUBEL (350)
- (334) DIXON (D.).- *Biol. Rev.* 1929, 4, 352, cité par AUBEL (350)
- (335) LASSEUR (Ph.), MELCION (J.).- Différenciation de *Bacillus mesentericus niger* Lunt et *Bacillus lactis niger* Gorini par les sels de manganèse.
Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1942, 13, 189.
- (336) LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.), PEPIN (J.).- Influence de l'aliment hydrocarboné sur la chromogénèse de quelques bactéries.
Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1942, 13, 153.
- (337) LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.), SIRGUEY (H.), FERRY (F.).- Observations sur la chromogénèse de *Bacillus aurantiacus tingitanus*.
Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1935, 8, 53.

- (338) LASSEUR (Ph.), SIRGUEY (H.).-- Influence du pH sur la chromogénèse de *Bacillus mesentericus niger*.
Trav. Labo. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1934, 7, 57.
- (339) LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.).-- Influence du pH sur l'aspect des cultures de *Bacillus chlororaphis*.
Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1936, 9, 35.
- (340) LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.), MOULIN (A.).-- Relation entre le pH du milieu LI et la chromogénèse des bactéries du groupe *Prodigiosus*.
Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1937, 10, II.
- (341) MARCHAL (J.G.).-- Extraction des pigments microbiens.
Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1956, 18, sous presse.
- (342) MARCHAL (J.G.), BENE (R.).-- Constitution chimique des pigments microbiens produits par *Bacillus roseus fluorescens*. et *Pseudomonas cattleyaecolor*.
Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1956, 18, sous presse.
- (343) MARCHAL (J.G.), POUTEAU-THOUVENOT (M.).-- Influence des pigments rouges et de leurs substances mères incolores, produits par *Bacillus roseus fluorescens* et *Pseudomonas cattleyaecolor* sur la respiration des germes homologues et hétérologues.
Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1956, 18, sous presse.
- (344) FRIEDHEIM. -- Compt. Rend. Soc. Biol. 1932, 110, 353.
- (345) MARCHAL (J.G.), ADAMS (R.).-- Présence de fer dans les pigments rouges produits par *Bacillus roseus fluorescens* et *Pseudomonas cattleyaecolor*.
Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1956, 18, sous presse.
- (346) GODIN (P.).-- Etude du processus de transformation des acides di- et tricarboxyliques chez *Penicillium brevicompactum*.
Ant. van Leeuwenhoeck 1955, 21, 12.
- (347) NISMAN (B.), VINET (G.).-- L'arsénite de sodium, inhibiteur spécifique des aminoacides réductases des bactéries anaérobies strictes.
Compt. Rend. Ac. Sci. 1949, 229, 675.
- (348) NISMAN (B.), VINET (G.).-- Le catabolisme oxydatif des acides aminés chez les bactéries anaérobies strictes.
Ann. Inst. Pasteur Fr. 1949, 77, 277.
- (349) NISMAN (B.), THOUVENOT (M.).-- Etude du métabolisme des acides aminés chez les bactéries anaérobies du groupe de *Cl. sporogènes*.
Ann. Inst. Pasteur Fr. 1948, 75, 310.
- (350) AUBEL (E.), ROSENBERG (A.), SZULMAJSTER (J.).-- Contribution à l'étude de la fermentation et de la respiration de *E. coli*. I) Action de quelques inhibiteurs sur la respiration et la fermentation de *E. coli*. II) Action des inhibiteurs sur les déshydrogénases.
Biochim. Biophys. Acta 1950, 5, 228 et 255.

(351) DUPAIX (A.).- *B.caryocyaneus* Beijerinck-Dupaix 1930. Etude morphologique et biologique. Recherches sur le mécanisme du phénomène de Charrin et Roger.

Thèse Doct. Univ. Nancy. Pharm. 1933.

(352) BROH-KAHN (R.H.), MIRSKY (I.A.).- Etudes sur l'ansérobiose. I) Nature de l'inhibition de la croissance de *E.coli* traité par le cyanure et par des systèmes oxydo-réducteurs réversibles.

J.of Bacteriology. 1938, 35, 455.

°
° °

- BIBLIOGRAPHIE : INDEX ALPHABETIQUE -
=====

- ABELSON (P.H.): 198.
ACHER (R.) et coll.: 105 - 113 - 300.
ADAMS (R.A.): 218.
ADAMS (B.A.); HOLMES (E.L.): 144.
AGREN (G.), NILSSON (T.): 169.
AJL (S.J.); et coll. 180 - 269 - 274 - 275 - 276 - 277.
ARCHIBALD (R.M.): 149
AUBEL (E.) et coll.: 350.
- BADDILEY (J.), GALE (E.F.): 177.
BARRETT (J.T.), KALLIO (R.E.): 273.
BARRY (G.T.) et coll.: 293.
BARRENSCHEEN (H.K.), DREGUSS (H.): 239.
BATELLI, STERN: 333.
BEAUCHESNE (G.), NETTIEN (G.): 155.
BECK (E.S.), LINDSTROM (E.S.): 278.
BENTLEY (H.R.), WHITEHEAD (J.K.): 141.
BISERTE (G.), OSTEUZ (R.): 163
BLACKBURN (S.), LOWTHER (A.G.): 136
BLAISE , GAULT: 251
BLASS (J.): 116
BLASS (J.), et coll. 65 - 137 - 193 - 315.
BLOCK (R.J.): 107 - 147.
BOISSONAS (R.A.): 16, 94, 126
BORELL (H.): 332
BORSOOK (H.) et coll: 294.
BOULANGER (P.), BISERTE (G.): 79
BRIMLEY (R.C.): 120
BROH-KAHN (R.H.), MIRSKY (I.A.): 352
BRYANT (F.), OVERELL (B.T.): 226
BURRIS (R.H.): 263
BURSTALL (F.H.) et coll.: 71
BUTIAUX (R.), et coll: 67.
- CABELLI (V.J.): 279
CAMPBELL (J.J.R.), STOKES (F.N.): 272
CANNAN (A.K.): 74
CARLES (J.): 311
CASE (E.M.): 240
CASIDA (L.E.), KNIGHT (S.G.): 308
CAVALLINI (D.), FRONTALI (N.): 207
CAVALLINI (D.), FRONTALI (N.), TOSCHI (G.): 37, 134
CEDRANGOLO, CADARANTE: 259
CHARGAFF (E.), LEVERNE (C.), GREN (C.): 114
CHEFFTEL (R.), MUNIER (R.), MACHEBOEUF (M.): 222
CLEAVER (C.S.), et coll: 150
COHEN (G.N.): 258
CONSDEN (R.), GORDON (A.H.): 75
CONSDEN (R.), GORDON (A.H.), MARTIN (A.J.P.): 4, 42, 45, 73, 76

CONSDEN (R.), MARTIN (A.J.P.), SYNGE (R.L.): 15
COOLIDGE: 313
CRAMER (F.): 32, 36
CREMER (H.), TISELIUS (A.): 301.
CRUMPLER (H.R.), DENT (C.E.): 17
CURZON (G.), GILTROW (J.): III.

DAGLAY (S.), et coll.: 50, 197
DAKIN (H.D.), DUDLEY (H.W.): 238
DALGLIESH (C.E.): 109
DARMON (P.), FAUCQUEMBERGUE (D.): 166
DAVIES (C.W.), HUGUES (R.P.), PARTRIDGE (S.M.): 153
DAVIS (B.D.): 55, 56
DAY (D.T.): 2
DENT (C.E.): 19, 83, 132, 223
DE WAEL (J.), DIAZ CADAVIECO (R.): 168
DEWAN (J.G.): 202
DIXON (D.): 334
DRAPER (O.), POLLARD (W.): 92
DUPAIX (A.): 351
DURRUM (E.L.): 156, 303

EFFRONT (J.): 327
ENGLIS (D.T.), FIESS (H.A.): 296
EULER et Coll.: 201, 260
EVANS (J.): 329

FELIX (K.) et coll: 47
FENTON (H.J.H.), JONES (H.O.): 264
FENTON (H.J.H.), WILKS (W.A.): 267
FEWSTER (M.E.), HALL (D.A.): 233
FINK (H.): 282
FISHER (R.), et coll: 119
FORSYTH (W.G.C.): 68
FOWDEN (L.): 20
FOWDEN (L.), PENNEY (J.R.): 167, 247
FRATEUR (J.), SIMONART (P.), COULON (T.): 51
FREUDENBERG (K.) et coll.: 297
FRIEDHEIM: 344
FRIEDMAN (T.E.), HAUGEN (G.E.): 206
FRIEDMAN (L.), KOSOWER (E.): 255
FROMAGEOT (C.), JUTISZ (M.), TESSIER (P.): 195

GABRIEL: 252
GAUS: 145
GIDDEY (C.): 18
GILMAN (C.M.), et coll: 309
GIRI (K.V.): 28
GIRI (K.V.), et coll: 29, 30.
GODIN (P.): 187, 346
GOODALL (R.R.), LEVI (A.A.): 298
GOPPELSROEDER: 280

GORDON (H.), MARTIN (A.J.P.), SYNGE (R.L.H.): 290
GRAHAM, MAC GINNIS: 99
GRASMAN, ARNIM: 106
GRIESSBACH (R.): 146
GRIGNARD (V.): 266
GUNSALUS (I.C.), BELLAMY (W.D.): 175

HAGDAH (L.), TISELIUS (A.): 35
HARRIS (J.), WORK (T.S.): 44
HAUGAARD (G.), KRONER (T.D.): 314
HAWARY (M.F.S.), THOMPSON (R.H.S.): 208, 209
HEDEN (C.G.): 89
HIGGINS (L.F.), FIELD (J.): 10
HOCKENHULL (D.J.D.), et coll: 60
HOLDEN (J.T.), WILDMAN (R.B.), SNELL (E.): 171
HORNE (R.E.), POLLARD (A.L.): 299
HOUSEWRIGHT (R.D.), THORNE (C.B.): 61
HULME (A.C.) et coll: 227, 228

INGOLD (C.K.): 254
ISHERWOOD (F.A.), JERMYN (M.A.): 13

JERMSTAD (A.), JENSEN (K.B.): 221
JOHANSEN (G.), NICKERSON (W.J.): 98

KARLSSON (J.L.), BARKER (H.A.): 271
KATZ (J.), CHAIKOFF (I.C.): 225
KAWERAN (E.), WIELAND (TH.): 115
KENTON (A.S.) et coll: 131
KLATZKIN (C.): 130
KNOOP (F.), OSTERLIN (H.): 200
KOEPEL (A.J.), et coll: 59
KOWALBASSY (G.N.), CLASSIDY (H.G.): 21
KREBS (H.A.), et coll: 181, 326
KUNKEL (H.), TISELIUS (A.): 302

LANDUCCI (J.M.), PIMONT (M.): 128
LASSEUR (PH): 213, 214
LASSEUR (PH.) et coll: 215, 216, 217, 281, 287, 318, 319, 320, 335,
336, 337, 338, 339, 340.

LEDERER (E.): 283
LEDERER (M.): 284
LE PAGE (G.A.): 245
LERCHE (C.): 192
LICHSTEIN (H.C.): 270
LICHSTEIN (H.C.) et coll: 174, 261
LIPMANN (F.): 330
LISSITZKY (S.), et coll: 82
LU (G.D.): 241
LUDERITZ (O.), WESTPHAL (U.): 26
LUGG (J.W.H.), OVERELL (B.T.): 219
LWOFF (A.): 317

MACHEBOEUF (M.): 12
MACHEBOEUF (M.); et coll: 3, 81, 205
MAC LEOD (J.): 328
MAC FARREN (E.F.): 93
MAIS (I.M.), MACEK (K.): 140
MARCHAL (J.G.): 268, 341
MARCHAL (J.G.) et coll: 142, 143, 184, 185, 186, 262, 342, 343, 345
MARTIN (A.J.P.), MITTELMANN (R.): 129
MARTIN (A.J.P.), SYNGE (R.L.M.): 7
MARTIUS (C.), NITZ-LITZOW (D.): 231
MASON (H.); BERG (C.P.): 54
MENTZER (C.H.), CROMENBERGER (L.): 154
METZLER (D.E.), SNELL (E.E.): 211
MEUNIER (P.): 5
MEYER (K.H.): 265
MEYERHOF (O.), LOHMANN (K.): 331
MIDDLEBROOK (W.R.): 158
MIYAMOTO (H.), AKAMA (K.), MORITA (E.), IKEDA (T.): 248
MOGASANIK (B.), UMBARGER (H.E.): 237
MONDOLFO (U.), CAMBONI (V.): 117
MONDOLFO (H.), HOUNIE (E.): 196
MONOD (J.): 310
MOORE (S.), STEIN (W.H.): 123
MULLER (R.H.): 24
MUNIER (R.), et coll: 33, 38, 220

NAFTALIN (L.): 121
NEEDHAM (D.M.): 256
NEISH (W.J.P.): 244
NIELSEN (N.): 190
NISMAN (B.) et coll: 347, 348, 349
NORDMANN (R.) et coll: 230
NOVELLIE (L.): 87

OVERELL (B.T.): 23

PARTRIDGE (S.M.): 78, 85, 152
PARTRIDGE (S.M.), et coll: 148, 160
PATTE (F.): 139
PATTON (A.R.) et coll: 101, 102
PENEAU (H.), SAIDS (E.), ANDRETTI (C.): 22
PHILIPS (D.): 97
PHILIPS (D.), POLLARD (A.): 229
POLONOVSKI (M.) et coll: 122, 316
POLSON (A.): 118, 124, 194
PORTER (R.R.): 162
POUTEAU-THOUVENOT (M.): 212
PROOM (H.), WOIWOD (A.J.): 11

QUASTEL (J.H.): 324
QUASTEL et coll: 321, 325

RABINOVITZ (J.C.), SNELL (E.E.): 170
RAYNAUD (M.), GROS (F.): 203

REED (L.): 70
 REINDEL (F.), HOPPE (W.): 112
 ROVERY (M.), FABRE (C.): 135, 164
 ROWSELL (E.V.): 62
 RUTTER (L.): 25

 SAIFER (A.), ORESKES (I.): 108
 SANGER (F.): 39, 40, 157, 161
 SANGER (F.), TUPPY (H.): 41
 SANTER (M.), AJL (S.J.): 305
 SAVARY (P.): 34
 SCRIBAN (R.): 80
 SELIGSON (D.), SHAPIRO (B.): 210, 242
 SENEZ (J.C.): 199
 SIMONART (P.), et coll: 49, 188, 189
 SMITH (F.), SPRIESTERBACH (D.): 234
 SNELL (E.E.): 173
 STADTMAN (E.R.), STADTMAN (Th.): 183
 STEIN (W.H.), MOORE (S.): 77, 292
 STRAIN: 312
 SWIM (H.E.), KRAUPITZ (L.O.): 182
 SYNGE (R.L.M.): 43, 159, 288, 291
 SZENT-GYORGYI (A.): 138

 TABONE (J.) et coll: 84, 110
 TABOR (H.), HAYALSKI (O.): 322
 TARA RAO, GIRI (K.V.): 31
 TAUBER (H.): 243
 THUNBERG (T.): 323
 TIBALDI (E.): 52
 TIBALDI (E.), TOZZOLI (G.): 53
 TISELIUS (A.): 9, 285
 TISELIUS (A.) et coll: 72, 286
 TOENNIES (G.), KOLB (J.J.): 103
 TONHAZY (N.E.), PELCZAR (M.J.): 57
 TURBA (F.) et coll: 151

 UMBREIT (W.W.) et coll: 172, 176, 178, 204

 VAN DUUREN (A.J.): 235
 VAN HALTEREN (M.B.): 133
 VAS (K.): 232

 WARBURTON (R.H.) et coll: 58
 WAY (J.T.): 306
 WEIBULL (C.): 165
 WEIL (H.), WILLIAMS (T.I.): 1
 WEISS: 8
 WIELAND (Th.): 48, 91
 WIELAND (Th.) et coll: 236, 295
 WIGGINS (L.F.), WILLIAMS (J.H.): 90
 WILLIAMS (R.J.), KIRBY (H.): 14
 WILSON : 6
 WISLICENUS: 249, 250

WOIWOD (A.J.): 100, 104, 127
WOIWOD (A.J.), et coll: 63, 66, 96
WOOD (W.A.) et coll: 179
WORK (E.): 64, 69, 86, 191

YANOFSKI (C.): 88
YEMMI (E.W.); COCKING (E.C.): 246

ZAHN (H.): 46, 95
ZENISEK (A.), KRAL (J.A.): 224
ZIMMERMANN (G.), NEHRING (K.): 27.

Vu,
NANCY, le 23 Février 1956
Le Président de Thèse
J.G. MARCHAL

Vu et Approuvé
NANCY, le 24 Février 1956
Le Doyen de la Faculté de
Pharmacie,
F. KAYSER

Vu et Permis d'imprimer
NANCY, le 27 Février 1956
Le Recteur de l'Académie
Président du Conseil de l'Université
G. MAYER

